



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTADO DA ARTE, EM 2014, DOS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE IODO IN VITRO

Trabalho submetido por
João Hugo Martins Rodrigues
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Fevereiro de 2015



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTADO DA ARTE, EM 2014, DOS MÉTODOS DE
DETERMINAÇÃO DE IODO, IN VITRO**

Trabalho submetido por
João Hugo Martins Rodrigues
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Doutora Zilda Morais

Fevereiro de 2015

Dedicatória

Dedico este trabalho final aos meus pais, por todo o seu apoio, carinho e amor incondicionais e por me terem sempre apoiado em todas as batalhas que travei a vós estou eternamente grato.

Agradecimentos

Aos meus pais e avós, por todo o seu respeito, amor e educação, que ajudaram a construir a pessoa que hoje sou.

Aos meus amigos e às longas horas de companheirismo, com um especial destaque para o João Silva, a Catarina Santos, Ana Ferreira, Nuno Trindade, Rita Vargas, entre outros que sempre me apoiaram, nos bons e maus momentos.

À minha paciente e muito prestável orientadora, Professora Doutora Zilda Morais por todo o apoio prestado na pesquisa documental e por todo o acompanhamento ao longo da investigação.

A todos os restantes que aqui se sentirem incluídos, que de algum modo contribuíram para que este dia fosse possível, um bem haja.

Resumo

Este trabalho teve como objectivo analisar o estado da arte, em 2014, dos métodos de determinação de iodo *in vitro*. Nesse sentido, realizou-se uma revisão bibliográfica sobre esta matéria, no período de Janeiro de 2010 a Janeiro de 2015, tendo-se encontrado 34 artigos pertinentes.

No estudo que foi realizado foram encontrados 6 métodos de determinação do teor de iodo, Método colorimétrico, Irradiação com activação de núcleo, Cromatografia, Electroforese capilar, Conversão ao estado atómico seguido de medida de emissão ou absorção de massa e com Raios-X. De entre as publicações analisadas, 62% adoptaram um método de conversão ao estado atómico seguido de medida de emissão ou absorção de massa, sendo o mais prevalente o método ICP-MS. Esta prevalência deveu-se ao exelente limite de detecção da técnica, á sua elevada sensibilidade e á capacidade de análise multielementar.

Quanto ao tipo de amostras, em 29% dos artigos analisados foi determinado o teor de iodo em alimentos provenientes do mar. 7 artigos era referentes a determinações de iodo em amostras de leite, 6 outros referentes a determinação de iodo em tecidos e amostras biológicas e ainda outros 6 artigos referentes á determinação de iodo em amostras de sal de mesa. Nas restantes publicações investigaram-se os teores de iodo em amostras de água, ar atmosférico, produtos farmacêuticos, alimentos, entre outros.

Nos 34 artigos estudados, encontraram-se métodos com diferentes graus de aplicabilidade e custo. Os métodos referidos apresentaram-se em ordem crescente de complexidade de execução.

PALAVRAS-CHAVE: Determinação de iodo, *in vitro*, métodos de determinação de iodo, amostras

Abstract

In vitro iodine determination method state of art was the aim of this study. For this reason, a bibliographic review was made concerning the iodine determination methods in published articles, between January 2010 and January 2015. Were found 34 relevant articles.

In the study that was developed, it were found 6 main methods to determine iodine content. Those were colorimetry, irradiation with nuclear activation, chromatography, capillary electrophoresis, conversion to atomic state followed by emission or mass absorption and X-ray. Between the analyzed articles, 62% adopted one method of conversion to atomic state, followed by emission or mass absorption, being the most prevalent, the ICP-MS method. This is due to his excellent detection limit, his high sensibility and the multielemental analysis. About the type of samples, in 29% of the studied articles, iodine determination was made in seafood samples. 7 articles are about iodine determination in milk samples, another 6 were about iodine determination in biological samples, and other 6 were about table salt iodine determination. In the other publications, iodine was determined in air samples, water samples, food samples and pharmaceutical products.

In the 34 studied articles it were found methods with variable degrees of applicability and cost. The presented methods are in increasing order of complexity of implementation.

KEY-WORDS: Iodine determination, in vitro, iodine determination methods, samples

Índice

Dedicatória	3
Agradecimentos	5
Resumo	7
<i>Abstract</i>	8
Índice	9
Índice de Figuras	11
Índice de Tabelas	12
Lista de Acrónimos	13
1. Introdução	15
1.1 Objectivo e Metodologia	15
1.2 Iodo, características físico-químicas	16
1.3 Distribuição na natureza	17
1.4 Aplicações do iodo	20
1.5 Papel do iodo no metabolismo normal e função tiroideia	21
1.6 Papel do iodo na gravidez	24
1.7 Distúrbios pela deficiência de iodo	26
1.8 Especificação do iodo	28
2. Revisão analítica dos métodos de determinação de iodo	30
2.1 Métodos in vitro	32
2.1.1 Método colorimétrico	33
2.1.2 Irradiação com activação de núcleo	37
2.1.2.1 Análise por activação de neutrões	37
2.1.2.2 Análise por activação de partículas carregadas	41
2.1.3 Cromatografia	44
2.1.3.1 Cromatografia gasosa	44
2.1.3.2 Cromatografia iónica	47
2.1.3.3 Cromatografia líquida de alta eficácia	49
2.1.4 Electroforese capilar	52
2.1.5 Conversão ao estado atómico, seguido de medida de emissão, ou de absorção ou de massa.	56
2.1.5.1 Espectroscopia de absorção atómica de chama	56

2.1.5.2 Espectometria de massa por plasma indutivamente acoplado	58
2.1.6 Raios-X	68
2.2 Isótopos de iodo	71
3 Análise comparativa dos métodos	72
4 Bibliografia	77

Índice de figuras

Figura 1 : Iodo metálico a iniciar o processo de sublimação (adaptado de www.http://images-of-elements.com/iodine.php , 2014)	16
Figura 2 : Distribuição do Iodo na natureza (Johnson, 2003)	18
Figura 3 : Ciclo do iodo (Romaris-Hortas, 2012)	18
Figura 4 : Distribuição global da produção de iodo (adaptado de British Geological Survey, 2006)	20
Figura 5: Aplicações industriais do iodo (adaptado de ICCID, 2008)	21
Figura 6 : Metabolismo do iodo numa célula tiroideia normal (adaptado de Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism, 2007)	22
Figura 7: Método cinético-colorimétrico, Desaparecimento da cor do complexo de sulfato de amónio-cério. Reacção de Sandell-Kolthoff. (WHO, 2007)	34
Figura 8 : Auto AnalyzerIII (Seal Analytical, 2013)	36
Figura 9: Reactor SLOWPOKE-2 da Universidade de Dalhousie	39
Figura 10: Melhoramento do limite de detecção com o numero crescente de ciclos em PC-INAA-CSS (Adaptado de Isaac-Olive & Chatt, 2012).	40
Figura 11: AIC-144 isochronous cyclotron (The Niewodniczan'ski Institute of Nuclear Physics Polish Academy of Science)	43
Figura 12 : Esquema do sistema de derivação microfluida (Pang, 2015)	46
Figura 13: Representação esquemática de um equipamento de electroforese capilar	53
Figura 14: Condições da injeção e condições do tampão utilizados para a determinação do status de iodo por electroforese capilar, com detecção UV, com auto empilhamento da amostra. (Macedo et al, 2014)	55
Figura 15: Elementos detectáveis por análise de ICP-MS (Skoog Holler, & Crouch, 2007)	60
Figura 16 : Icp-MS, modelo X Series II	60
Figura 17: Diagrama esquemático do sistema m-USN/TCS-VG-ICP-OES (Matusiewicz & Slachcinski, 2010)	67
Figura 18: Espectómetro de polarização EDXRF, Epsilon 5	70
Figura 19: Distribuição dos artigos analisados por métodos de determinação de iodo	75

Índice de tabelas

Tabela 1 Teor de iodo em alimentos variados (Adaptado de Office of Dietary Supplements, 2011)	19
Tabela 2: – Critérios epidemiológicos para avaliar o estado nutricional relativo ao iodo baseados na mediana das UIC de mulheres grávidas (Who, 2007)	25
Tabela 3 : Espectro dos distúrbios pela deficiência de iodo (Who, 2007)	26
Tabela 4 : Recomendações para o aporte diário de iodo, por faixa etária ou grupo populacional(Who, 2007)	27
Tabela 5: Ingestão diária de iodo recomendada (Who, 2007)	27
Tabela 6: Espécies de iodo encontradas na natureza (Hou, 2009)	28
Tabela 7 : Resumo dos métodos de determinação de iodo in vitro	31
Tabela 8: Comparação dos valores meritórios obtidos por FAAS relativamente a determinação de iodo em produtos lácteos, face a outros métodos conhecidos (Yebra& Bollaín, 2010)	57
Tabela 9 : Tipos de amostra agrupados por método de determinação de iodo	73

Lista de acrónimos

CE - Electroforese capilar

DDI - Distúrbios pela Deficiência de iodo

DDR: Dose Diária Recomendada

DGS: Direção Geral de Saúde

DIT: Diiodotirosina

FAO - Food and Agriculture Organization

FDA - Food and Drug Administration

GC - Cromatografia Gasosa

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC-ICP-MS - Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado

HPLC-UV - Cromatografia Líquida de Alto Desempenho com Ultra Violeta

HT - Hormonas Tiroideias

IC - Cromatografia Iónica

ICCIDD: International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders

ICP-AES - Espectrometria de emissão atómica por plasma indutivamente Acoplado

ICP-MS - Espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado

IDD: Iodine Deficiency Disorders

INAA - Instrumental Neutron Activation Analysis

IOM: U.S. Institute of Medicine

LC-ICP-MS - Cromatografia Líquida associada à ICP-MS

MIT – Monoiodotirosina

NAA - Análise por Activação de Neutrões

RDA: Recommended Dietary Allowance

RNI: Recommended Nutrient Intake

SEC - Cromatografia de Exclusão Molecular

SSKI - Solução Saturada de Iodeto de Potássio

SPEDM: Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo

T3: Triiodotironina

T4: Tiroxina

Tg: Tiroglobulina

TSH: Thyroid Stimulating Hormone

UIC: Urinary Iodine Concentration

UN - United Nations

USI - Universal Salt Iodization

UNICEF: United Nations Children's Fund

WHO: World Health Organization

OMS – Organização Mundial de Saúde

1. Introdução

1.1 Objectivo e metodologia

Este trabalho teve como finalidade realizar uma revisão bibliográfica sobre os principais métodos de determinação do teor de iodo *in vitro*, em Outubro de 2014. Para isso foram utilizados os motores de busca Ebsco Host, Google Académico, Medline e Scielo.

Relativamente às palavras-chave, utilizaram-se: *iodine determination methods*, *iodine detection*, *iodine analysis*, *iodine in vitro*, metodos de determinação de iodo, detecção de iodo, iodo in vivo e iodo in vitro.

Os artigos seleccionados foram os mais actuais, a partir de 2010, no que concerne aos métodos de determinação, tendo sido utilizados alguns artigos anteriores a essa data na caracterização introdutória do iodo.

Para a exposição do trabalho, optou-se por primeiramente descrever o iodo, a sua especiação e distribuição no planeta, assim como a sua importância no metabolismo humano. Seguidamente adoptou-se descrever os princípios físico-químicos dos métodos de determinação de iodo, enfatizando os métodos de referência. Finalmente, agruparam-se os métodos descritos segundo parâmetros, comuns, como o tipo de amostra, o tempo de execução, a sensibilidade, e custos associados.

1.2 Iodo, características físico-químicas



Figura 1 : Iodo metálico a iniciar o processo de sublimação (adaptado de images-of-iodine, 2014)

O iodo foi descoberto, em 1811 pelo químico francês Bernard Courtois. É um sólido lustroso negro azulado que ocorre na natureza na forma estável ^{127}I . São conhecidos 37 isótopos, sendo unicamente estável na forma ^{127}I . Na atmosfera também ocorre na forma radioativa de iodo-129, interagindo com partículas de xenon. Exibe propriedades metálicas e é unicamente solúvel em água, apesar de muito ligeiramente. O iodo volatiliza à temperatura ambiente sob a forma de um gás azul-arroxeadado, como se pode observar na figura 1, com odor irritante. Ocorre na natureza na forma de íons de Iodo, essencialmente nas formas de iodeto e iodato. (Human Health Fact Sheet, 2005).

É facilmente solúvel em solventes orgânicos, como o triclorometano, tetraclorometano, etanol e dissulfeto de carbono, produzindo soluções de coloração arroxeadada. Pode apresentar vários estados de oxidação (-1, +1, +3, +5 e +7) podendo assim apresentar-se sob variadas formas químicas, sendo mais usualmente encontrado nas formas de I_2 (iodo), I^- (iodeto), IO_3^- (iodato) e CH_3I (iodometano).

1.3 Distribuição na natureza

Ao contrário de muitos outros elementos, a concentração de iodo do solo não é determinada pela concentração deste nas rochas subjacentes. Sugeriu-se que o iodo do solo derivava primariamente da erosão das rochas e também seria influenciado pelo movimento das placas tectônicas, no entanto mais recentemente depreendeu-se que a maior parte do iodo na biosfera tem origem nos oceanos (Zimmermann et al., 2008). Num relatório publicado pela British Geological Survey, Johnson (2003) refere que o iodo está largamente distribuído pela Natureza, como se pode observar na figura 2 e esteve presente na crosta terrestre durante os primórdios do desenvolvimento da Terra. Porém, com o passar dos anos, grandes quantidades deste elemento foram arrastadas da superfície da Terra, pela glaciação, neve e chuva, pelos ventos e pelos rios, bem como pelas enchentes em direcção ao mar. Desta forma, existe um ciclo de iodo na natureza, sendo que actualmente a maior parte desse elemento se encontra nos oceanos, como mostra a figura 3. A origem marinha de muitas rochas sedimentares reflecte-se nas suas concentrações de iodo ($0,4\text{--}30\text{ mg kg}^{-1}\text{ I}$), que tende a ser mais elevada do que nas rochas ígneas e metamórficas ($0,005\text{--}2\text{ mg I kg}^{-1}$), onde as altas temperaturas durante a sua génese podem expelir o iodo (Hou et al., 2009.)

A volatilização do iodo a partir dos oceanos é considerada a fonte principal de iodo para a atmosfera, sendo transferido através de mecanismos complexos dependentes das condições meteorológicas e atmosféricas, mas provavelmente envolvendo espécies voláteis, como CH_3I e I_2 (Bloss & Ball, 2009).

Pesquisas recentes reportaram a importância do HOI e o I_2 na determinação das concentrações atmosféricas de Iodo (Carpenter et al., 2013). A volatilização a partir de algumas espécies de algas contribui também para as concentrações de iodo atmosférico. O mesmo autor também sugeriu a correlação entre o iodo atmosférico, o plancton e algumas bactérias (Nitschke et al., 2011).

A chuva é um importante mecanismo de transporte de iodo, arrastando-o da atmosfera para o solo. Deste modo, em áreas onde a concentração atmosférica é alta, nomeadamente sobre os oceanos e em todo o litoral, a chuva terá uma concentração de iodo superior á que se verifica mais para o interior. (Aldahan et al., 2009)

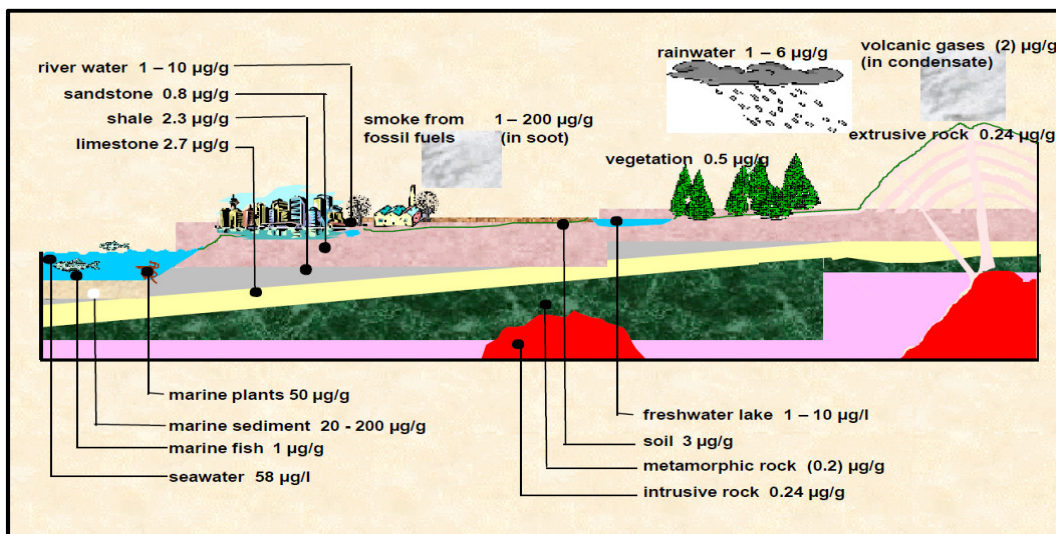


Figura 2 : Distribuição do Iodo na natureza (Johnson, 2003)

No meio ambiente o iodo ocorre, sobretudo nas águas e nos solos, estando ligado a compostos orgânicos ou em sais de iodato e iodeto. (Choengchan et al, 2003) .Nos alimentos ele encontra-se nos peixes, frutos do mar, algas, hortaliças, ovos, leites e nos seus derivados ocorrendo na forma de iodeto ou iodo orgânico, como se pode ver na tabela 1. (Blazewicz, 2012)

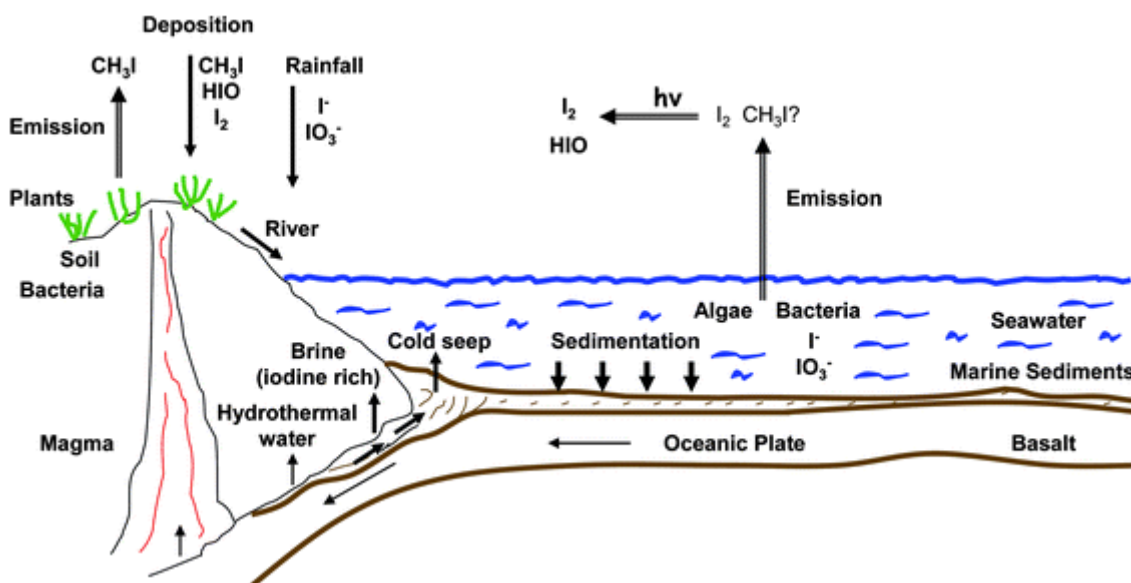


Figura 3 : Ciclo do iodo (Romaris-Hortas, 2012)

Teor de iodo em alimentos variados

Food	Approximate mcg/Serving	Daily Value ^a
Seaweed (nori), whole or sheet, 1 g	16-2,984	11%-1,989% ^b
Cod, baked, 3 oz.	99	66% ^b
Yogurt, plain, low-fat, 1 cup	75	50% ^b
Iodized salt, 1.5 g (about 1/4 tsp)	71	47% ^b
Milk, reduced fat, 1 cup	56	37% ^b
Fish sticks, 3 oz.	54	36% ^b
Bread, white, enriched, 2 slices	45	30% ^b
Fruit cocktail, canned in heavy syrup, 1/2 cup	42	28% ^b
Shrimp, 3 oz.	35	23% ^b
Ice cream, chocolate, 1/2 cup	30	20% ^b
Macaroni, enriched, boiled, 1 cup	27	18%
Egg, 1 large	24	16%
Tuna, canned in oil, drained, 3 oz.	17	11%
Corn, cream style, canned, 1/2 cup	14	9%
Plums, dried (prunes), 5 prunes	13	9%
Cheese, cheddar, 1 oz.	12	8%
Raisin bran cereal, 1 cup	11	7%
Lima beans, mature, boiled, 1/2 cup	8	5%
Apple juice, 1 cup	7	5%

Tabela 1. Teor de iodo em alimentos variados (Adaptado de Office of Dietary Supplements, 2011)

No Chile, o iodo é encontrado em minério de nitrato de sódio natural, enquanto no Japão e no resto do mundo, o iodo aparece principalmente em salmouras.

De acordo com a organização internacional Network For Sustained Elimination of Iodine Deficiency, existem no mercado global cerca de 29.000 milhões de toneladas de iodo. O Chile, Japão e EUA produzem 96,4% do iodo total, como se pode observar na figura 4. Os quatro maiores fluxos de exportação directa partem do Chile para os EUA, a Europa (através da Bélgica), a China e a Índia. As maiores produções mundiais de iodo estão concentradas no Chile (61,8% da produção mundial) e Japão (30% da produção global). Estima-se que as reservas actuais de iodo sejam superiores a 27 milhões de toneladas, capazes de suportar as necessidades mundiais por mais de 100 anos. (Iodine Network, 2011).

Na alimentação animal o iodo ocorre em folhagens, estando na forma de iodeto livre ou ligado a moléculas orgânicas. Também se utilizam rações com adição deste nutriente nas formas de iodeto de potássio ou iodato de cálcio. (Blazewickz, 2012)

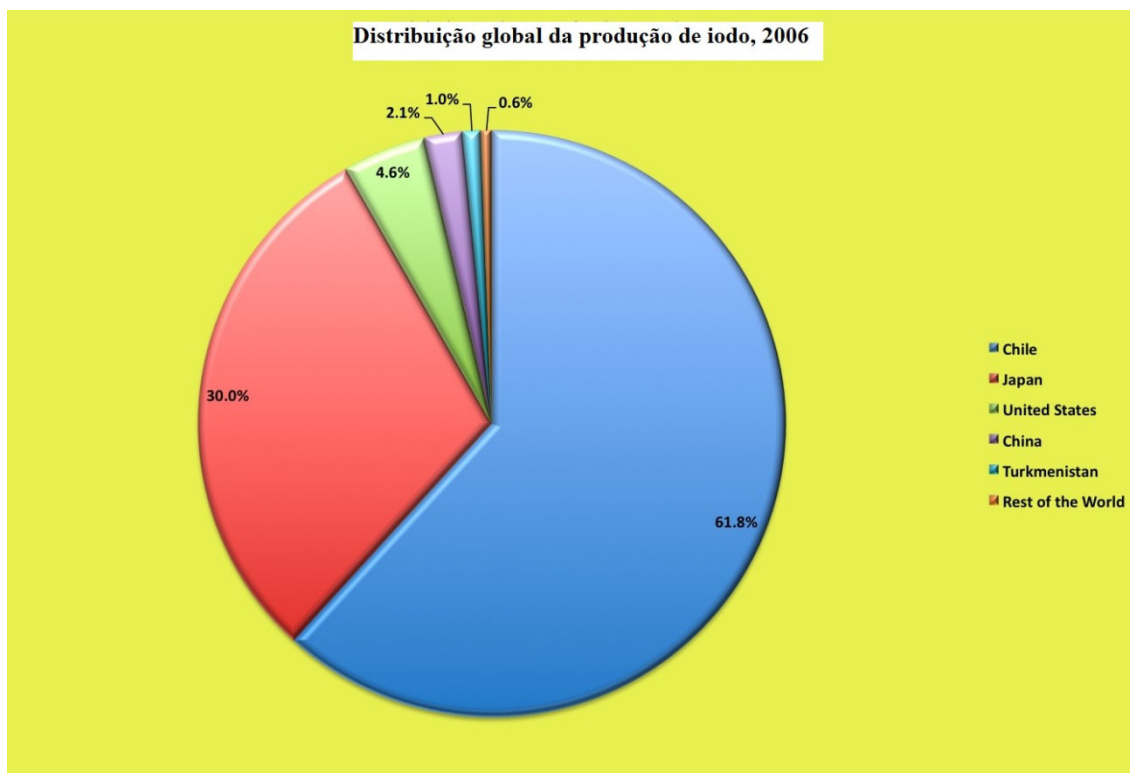


Figura 4 : Distribuição global da produção de iodo (adaptado de British Geological Survey, 2006)

1.4 Aplicações do iodo

O iodo tem numerosas aplicações, na medicina, na indústria farmacêutica e a nível tecnológico. A nível médico e farmacêutico, é utilizado na forma de tintura de iodo (solução de iodo e iodeto de potássio em etanol) como desinfetante da pele e na limpeza de feridas e escoriações apresentando propriedades anti-sépticas. É também utilizado como desinfetante para a água. O iodeto/iodato de potássio são utilizados como aditivos ou suplementos nutricionais, como por exemplo, no sal de cozinha (iodação do sal). Alguns compostos orgânicos de iodo são também utilizados como contraste em técnicas radiológicas e imagiológicas. Isótopos radioactivos do iodo, como o I^{131} são utilizados em numerosos procedimentos médicos, como a monitorização do fluxo de tiroxina a partir da tiroide. (Human Health Fact Sheet, 2005).

Este isótopo do iodo é também utilizado como terapia directa para destruir tecidos cancerígenos que continuam a acumular iodo, bem como para tratar a doença de Graves e outros tipos de cancro.

A nível tecnológico, como se pode verificar na figura 5, o iodo é utilizado na forma de iodeto de prata, em técnicas fotográficas, na produção de iodóforos e biocidas, como estabilizador do nylon, como herbicida e na produção de lasers. É também utilizado como explosivo na forma tri-iodeto de nitrogénio. É ainda utilizado no fabrico de lâmpadas de tungsténio, de forma a prolongar a sua vida útil e no fabrico de tintas. (Human Health Fact Sheet, 2005)

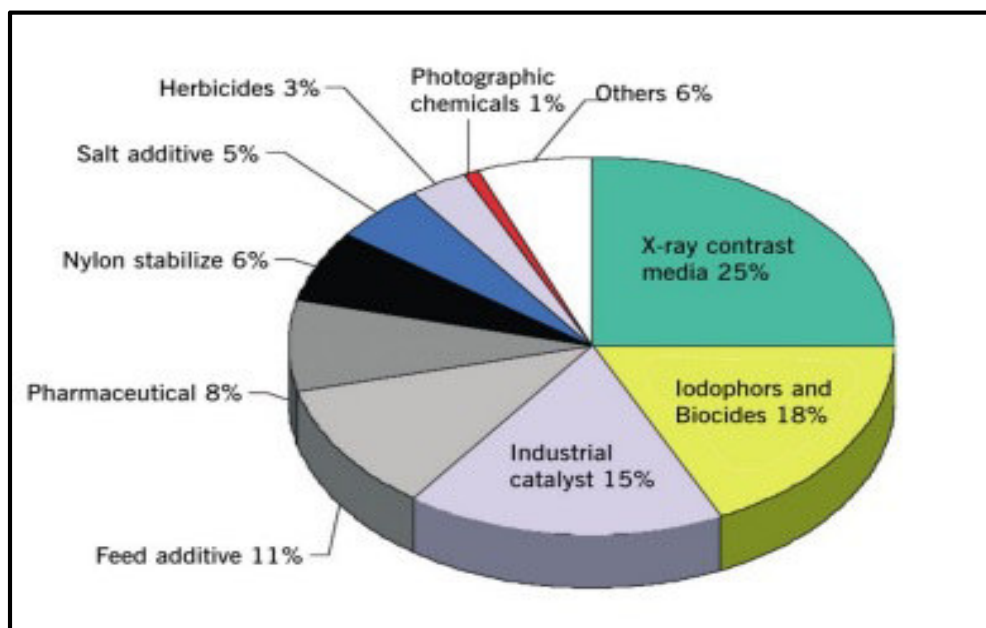


Figura 5: Aplicações industriais do iodo (adaptado de ICCID, 2008)

1.5 Papel do iodo no metabolism normal e função tiroideia

O iodo é um elemento químico fundamental para o bom funcionamento do corpo humano, desempenhando diversas funções no nosso corpo. Verifica-se que a sua importância é crescente desde o nascimento até à adolescência e estabiliza na fase adulta, exceptuando a sua relevância durante a gravidez e amamentação. Este elemento é indispensável na produção de hormonas tiroideias e também numa gravidez saudável, assim como na prevenção do aparecimento de algumas patologias, como o bócio. (Brownstein, 2009).

O iodo é indispensável para o normal metabolismo celular. Uma quantidade insuficiente de iodo no nosso corpo pode diminuir o nosso metabolismo basal, o que pode resultar em ganho de peso, cansaço e depressão. Devido ao facto das hormonas tiroideias

transcrição do gene da tiroglobulina e da tiroperoxidase; a transcrição do gene da tiroglobulina e da tiroperoxidase; o processamento da tiroglobulina e a sua exocitose para o colóide; a captação de iodo por activação do transportador de iões iodeto; a proteólise da tiroglobulina e libertação de T3 e T4 e a reabsorção da tiroglobulina a partir do colóide. (Brownstein, 2009)

No mecanismo da síntese e secreção de iodotironinas, a concentração do ião iodeto constitui um factor de regulação importante, quer pela diminuição de iodo (diminuição do rácio DIT/MIT e diminuição do rácio T4/T3), como pelo aumento de iodo (inibição da proteólise da tiroglobulina, levando consequentemente, a uma diminuição da síntese de T3 e T4).

Em casos de hipertiroidismo, a regulação da síntese de T3 e T4 pode conseguir-se através da administração de dois fármacos, nomeadamente antitiroideos (inibidores da tiroperoxidase) e inibidores aniónicos (que actuam sobre o transportador do ião iodeto, impedindo a captação de iodo pelas células foliculares). (Brownstein, 2009)

As hormonas T3 e a T4 são de importância fulcral na manutenção do metabolismo basal, essencialmente na manutenção do calor do corpo e também fundamentais para o bom funcionamento do sistema reprodutor. Além da actividade hormonal, é actualmente reconhecido pela comunidade científica que o iodo é um nutriente essencial para:

- o bom desenvolvimento do sistema nervoso central, coração, fígado e rins,
- o crescimento físico e neurológico,
- a conversão de betacaroteno em vitamina A,
- a síntese de proteínas.

1.6 Papel do iodo na gravidez

O iodo tem um papel crucial na promoção de uma gravidez saudável. A deficiência deste elemento é especialmente grave em mulheres que estejam grávidas ou em amamentação. Em grávidas pode provocar-lhes pressão arterial elevada e tem sido associada a abortos, nados-mortos, partos prematuros e anomalias congénitas nos seus bebés. Filhos de mães com grave carência de iodo durante a gravidez podem sofrer Cretinismo endémico, deficiência mental associada a mutismo, displegia espástica, estrabismo, hipotireoidismo e baixa estatura. O hipotireoidismo congénito devido à deficiência de iodo é a causa evitável mais comum de atraso mental no mundo. A deficiência de iodo mesmo ligeira, durante a gravidez, pode estar associada a uma baixa inteligência em crianças (Brownstein, 2009).

Nas gravidez o aporte iodado recomendado é superior devido a alguns factores importantes como o aumento na produção materna de T4, de 40-50%, de modo a manter o eutiroidismo materno e a transferir hormonas tiroideias para o feto, antes da tiroide fetal estar em funcionamento, a transferência de iodo para o feto, particularmente numa fase mais tardia da gestação e também ao potencial aumento da clearance renal de iodo.(Zimmermann, 2007)

Em Portugal, a Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo (SPEDM) realizou um estudo nacional sobre o aporte de iodo nas grávidas, tendo-se verificado que este era globalmente insuficiente de acordo com as recomendações da WHO – apenas 16,8% das grávidas do Continente apresentavam valores de iodúria adequados e nas Regiões Autónomas somente uma minoria de 5,4% atingia iodúrias satisfatórias. Tendo em conta estes resultados, a SPEDM recomendou a introdução de suplementação de iodo nas mulheres grávidas e nas lactantes em Portugal, motivando a Direção Geral de Saúde (DGS) a emitir a seguinte Orientação, em 26/08/2013: “As mulheres em preconceção, grávidas ou a amamentar devem receber um suplemento diário de iodo sob a forma de iodeto de potássio – 150 a 200µg/dia, desde o período preconcecional, durante toda a gravidez e enquanto durar o aleitamento materno exclusivo. (Limbert et al, 2010; Lopes et al, 2012).

A WHO, o ICCIDD e a UNICEF recomendam a mediana das concentrações urinárias de iodo (UIC) como principal método para avaliar o estado nutricional relativo ao iodo

em populações de grávidas, como se pode verificar na tabela 2 (WHO/ICCIDD/UNICEF, 2007).

Tabela 2: – Critérios epidemiológicos para avaliar o estado nutricional relativo ao iodo baseados na mediana das UIC de mulheres grávidas (Who, 2007)

UIC mediana (µg/L)	Aporte de iodo
<150	Insuficiente
150-249	Adequado
250-499	Mais do que adequado
≥500	Excessivo ^b

^a Para mulheres a amamentar ou crianças <2 anos, uma mediana urinária ≥100 µg/L pode ser usada para definir um aporte de iodo adequado.

^b O termo “excessivo” significa que excede a quantidade necessária para prevenir o déficit de iodo.

1.7 Distúrbios pela deficiência de iodo (DDI)

O déficit de iodo provoca múltiplos efeitos adversos no desenvolvimento e crescimento dos humanos, os quais, no seu conjunto, constituem os já referidos Distúrbios pela deficiência de iodo (DDI) com se pode observar na tabela 3. Os DDI resultam de uma produção insuficiente de hormonas tiroideias devido a um aporte de iodo inadequado. As doenças mais comuns que relacionam a glândula tiroideia com alterações do nível do micronutriente iodo são o hipotireoidismo, o hipertireoidismo, as tiroidites e os nódulos tiroidianos. (Zimmermann, 2009)

Tabela 3 : Espectro dos distúrbios pela deficiência de iodo (Who, 2007)

Grupo populacional	Consequências do déficit de iodo
Todas as idades	Bócio Hipotireoidismo Suscetibilidade aumentada à radiação nuclear
Feto	Abortamento espontâneo Nado-morto Anomalias congénitas Mortalidade perinatal
Recém-nascidos	Cretinismo endémico Mortalidade infantil
Crianças e adolescentes	Alterações da função cognitiva Atraso do desenvolvimento psicomotor Hipertireoidismo induzido pelo iodo
Adultos	Alterações da função cognitiva Hipertireoidismo induzido pelo iodo

Foram realizados estudos do turnover de iodo tiroideu, da captação tiroideia de isótopos radioativos do iodo, bem como do equilíbrio fisiológico de iodo no organismo, em indivíduos eutiroideus. Esses mesmos estudos foram utilizados para estimar as necessidades diárias de iodo. Com base nos dados obtidos, o U.S. Institute of Medicine (IOM), bem como a WHO (em conjunto com a UNICEF e o ICCIDD – International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders) propuseram aportes diários de iodo, muito semelhantes, como se pode observar na tabela 4. (Zimmerman, 2007, 2009)

Tabela 4 : Recomendações para o aporte diário de iodo, por faixa etária ou grupo populacional(Who, 2007)

Faixa etária	IOM (RDA ^a , µg/dia)	Faixa etária	WHO, UNICEF e ICCIDD (RNI ^b , µg/dia)
0-6 meses	110	Crianças 0-5 anos	90
6-12 meses	130		
Crianças 1-8 anos	90		
Crianças 9-13 anos	120	Crianças 6-12 anos	120
Adultos (≥ 14 anos)	150	Adultos (≥ 12 anos)	150
Gravidez	220	Gravidez	250
Lactação	290	Lactação	250
^a RDA = <i>Recommended dietary allowance</i> , definida como o aporte diário médio necessário para cobrir as necessidades de 97-98% dos indivíduos saudáveis de uma determinada faixa etária.		^b RNI = <i>Recommended nutrient intake</i> , definido como o aporte diário estimado para cobrir as necessidades de “praticamente todos” os indivíduos saudáveis de uma determinada faixa etária. Corresponde à dose diária recomendada (DDR).	

Requisitos e ingestão recomendada

Estima-se que a tiróide utilize diariamente de 60 a 80 µg de iodeto para atingir a sua produção habitual de hormonas tiróideas (Zimmerman, 2012).

Tabela 5: Ingestão diária de iodo recomendada (Who, 2007)

Idade ou Grupo Populacional	OMS/DDR (µg/dia)
Crianças 0 – 5 anos	90
Crianças 6-12 anos	120
Adultos > 12 anos	150
Gravidez	250
Lactação	250

1.8 Especificação do iodo

O iodo ocorre na natureza em diferentes espécies, apresentando cada uma delas características químicas, físicas e biológicas, como podemos ver na tabela 6

Tabela 6: Espécies de iodo encontradas na natureza (Hou, 2009)

Nome	Fórmula química	Ocorrência mais frequente
Iodeto	I ⁻	Água, minerais, seres vivos
Iodato	IO ₃ ⁻	Água, minerais
iodo molecular	I ₂	Ar
Periodato	IO ₄ ⁻	Água
Hipiodeto	IO ⁻	Ar, Água
iodometano	CH ₃ I	Ar, Água
Diodometano	CH ₂ I ₂	Ar, Água
iodoetano	C ₂ H ₅ I	Ar, Água
iodopropano	C ₃ H ₇ I	Ar, Água
iodobutano	C ₄ H ₉ I	Ar, Água
Bromoiodometano	CH ₂ BrI	Ar, Água
Triiodotironina	T ₃	Seres vivos
Tiroxina	T ₄	Seres vivos
Monoiodotirosina	MIT	Seres vivos
Diiodotirosina	DIT	Seres vivos
Triiodotironina reversa	rT ₃	Seres vivos
Partículas iodo-associadas	-	Ar, Água

A especificação de iodo pode ser concretizada por vários processos designadamente, por cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS), incluindo sistemas de separação por troca iónica e exclusão molecular. Estas técnicas são cientificamente muito atractivas mas, por serem bastante dispendiosas, não são usadas em larga escala. São também usadas técnicas de interacção de HPLC em conjugação com a espectrometria de emissão atómica de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

Para especificação do iodo inorgânico e orgânico em águas, vegetais, leite, pescado e amostras biológicas (soro, urina, fezes), recorre-se normalmente à pré-concentração e separação por meios clássicos de cromatografia de troca iónica, atingindo-se resultados confiáveis.

Podem ainda ser usados vários métodos para determinar níveis de iodo no ar, na água, nos solos, nos sedimentos, nos produtos farmacêuticos e nos alimentos.

O mais referido é o detector Instrumental Neutron Activation Analysis (INAA) com raios gama, mas também são utilizados os métodos de cromatografia iónica (IC), calorimetria, espectrometria de emissão atómica por plasma indutivamente acoplado (ICP-AES), cromatografia líquida de alto desempenho com ultravioletas (HPLC-UV) e o método ICP-MS.

2. Revisão dos métodos analíticos de determinação de iodo

A pesquisa foi realizada no Google Académico com as seguintes palavras *iodine analysis*, *iodine determination*. Ao restringir a pesquisa a artigos posteriores a 2010 e truncada para as palavras *iodine analysis* apareceram 280 resultados. Ao repetir o método para as palavras *iodine determination* apareceram 472 resultados. No entanto tanto para uma pesquisa como para a outra os artigos nem sempre remetiam para os métodos pretendidos. Na etapa seguinte, foram seleccionados os artigos que apresentavam os procedimentos adoptados nos métodos de determinação do teor de iodo, tendo sido efectuada uma análise de forma a verificar se os mesmos correspondiam a tematica que pretendíamos analisar. A análise recaiu assim sobre 34 artigos, como se pode verificar na tabela 7

No estudo que foi realizado foram encontrados 6 métodos de determinação do teor de iodo, Método colorimétrico, Irradiação com activação de núcleo, Cromatografia, Electroforese capilar, Conversão ao estado atómico seguido de medida de emissão ou absorção ou de massa e com Raios-X.

De modo a sistematizar a apresentação, os métodos vão ser apresentados por uma ordem crescente de complexidade, Em cada um deles, numa primeira fase vão ser apresentados os princípios dos mesmos e numa etapa seguinte os exemplos de execução do método.

Tabela 7 : Resumo dos métodos de determinação de iodo in vitro

Método colorimétrico	(Hedayati et al, 2011); (Jooste & Strydom, 2010); (Tonacchera et al (2013)
Irradiação com ativação de núcleo Neutrões EINAA, prótons CPAA.	(Fukushima & Chatt, 2012); (Isaac-Olive & Chatt, 2012); (Wojcik, Zagrodzki, Mietelski & Was, 2012)
Cromatografia	(Pang, Carpenter & Lewis, 2015) (Shinoda et al, 2011) (Gupta et al, 2011) ; (Nitschke & Stengel, 2015)
Electroforese capilar	(Macedo et al, 2014)
Conversão ao estado atômico seguido de medida de emissão ou de absorção ou de massa (ICP-OES, ICP-MS, AAA)	(Yebra&Bollaín, 2010) (Yu <i>et al</i> , 2013) (Huynh et al, 2015); (Barbosa et al, 2013); (Han et al, 2012);(Hartwig et al, 2014); (Leppänen, Niemelä & Perämäki, 2014);(Lipiec et al, 2012); (Mesko et al, 2010); (Mesko et al 2014);(Michalke& Witte, 2014); (Muller, 2012); (Picoloto et al, 2014); (Romaris-Hortas et al, 2011); (Romaris-Hortas, Barreta & Pinero, 2012); (Romaris-Hortas et al, 2012); (Sun et al, 2010); (Zheng, Yamada & Yoshida, 2011); (Zheng et al, 2012) (Matusiewicz & Slachcinski, 2010) (Oliveira, Nóbrega & Pereira-Filho, 2012)
Com raios X	(Lu et al, 2013) (Takeda et al, 2011)

2.1 Métodos *in vitro*

Estão continuamente a ser desenvolvidas técnicas analíticas com o intuito de detectar quantidades muito pequenas do analito de interesse, com elevada precisão e exactidão. As técnicas mais clássicas, como a gravimetria, volumetria, espectrofotometria, fluorometria, entre outras, foram sendo gradualmente substituídas por novas técnicas como a fluorescência de raios x, espectrofotometria de absorção atómica, espectrometria por plasma indutivamente acoplado, espectrometria de massa, análise de activação de neutrões, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alto desempenho, entre outras. Anos mais tarde, a combinação de algumas destas técnicas originou novas técnicas como a cromatografia líquida de alto desempenho com espectrometria de massa, espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado e cromatografia gasosa com espectrometria de massa. A determinação de um analito pode ser realizada usando métodos directos ou indirectos, dependendo da função do analito na reacção e do mecanismo ou processo que está a ser estudado. Se o analito participa no processo de detecção, o método será directo, no entanto se o analito não estiver envolvido no processo de detecção, mas reaja ou interaja com uma das espécies químicas no sistema, então o método será indirecto. O iodo pode ser determinado usando quase todas as técnicas supracitadas, directa ou indirectamente, dependendo da técnica. A razão da escolha de uma técnica em detrimento da outra prende-se essencialmente com o propósito do estudo, a acessibilidade à técnica, a complexidade da matriz e o tipo de determinação analítica pretendida.

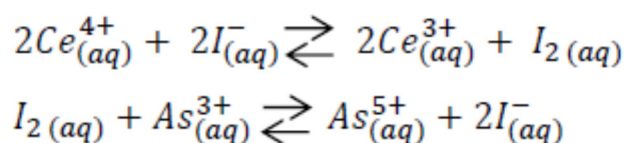
2.1.1 Método colorimétrico

Princípio do método

Os métodos espectrofotométricos foram largamente difundidos na determinação de iodo e os processos mais utilizados para a determinação deste elemento em matrizes complexas são baseados no método colorimétrico de Sandell-Kolthoff.

Este método, desenvolvido em 1934, obteve o nome de Sandell-Kolthoff, em honra aos químicos que o desenvolveram. Sem a presença de iões iodeto, esta reacção ocorre muito lentamente, demorando 36 ou mais horas, no entanto a presença de traços de iodeto aumenta a taxa de reacção.

Este método baseia-se na reacção de oxirredução entre o cério amarelo (IV) e o arsénio (III) que é catalisada pelos iões iodeto, passando para cério (III) incolor (figura 7), sendo a taxa de eliminação da cor amarela mensurada e relacionada com o conteúdo de iodo. A reacção é representada pela seguinte equação:



Habitualmente, os compostos de iodo orgânico não podem ser determinados sem uma etapa de digestão prévia, normalmente realizada utilizando ácido perclórico. Se o Tiocianato estiver presente em concentrações mais elevadas, como por exemplo, nas amostras de leite e urina, poderia interferir na etapa de determinação. Também podem ocorrer interferências na presença de traços de iões metálicos (prata e mercúrio) que podem reagir com o iodeto, bem como com substâncias que sofrem facilmente oxidação, nomeadamente nitrito, ácido ascórbico, e o ferro ferroso.

A reacção de oxirredução (Ce^{4+}/As^{3+}) processa-se com uma etapa a mais e apresenta um grande aumento de velocidade em relação à oxirredução sem a utilização do catalizador. A quantificação é realizada a 420 nm, pois os iões de cério IV são amarelos e ao diminuírem a concentração diminuem também a absorvância.

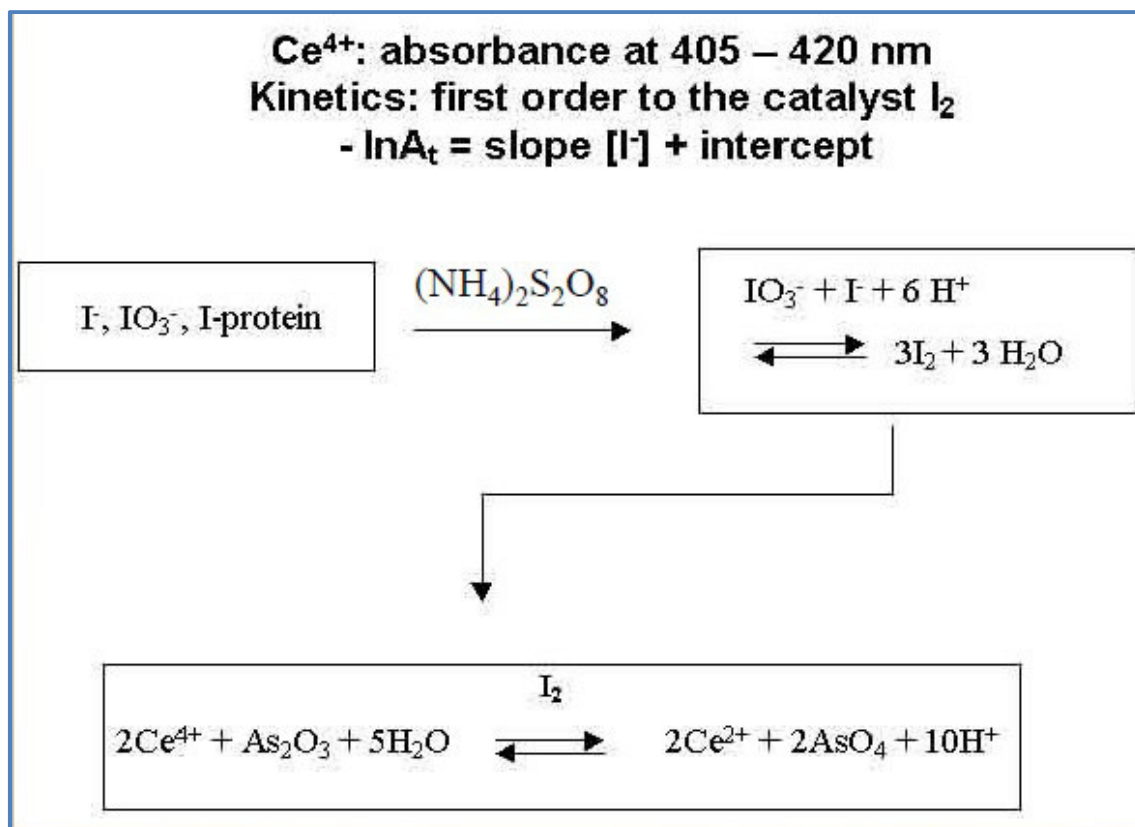


Figura 7: Método cinético-colorimétrico, Desaparecimento da cor do complexo de sulfato de amónio-cério. Reacção de Sandell-Kolthoff. (WHO, 2007)

Os limites de detecção dos métodos que utilizam a reação de Sandell-Kolthoff são bastante baixos 0,1 µg L⁻¹–9,30 µg L⁻¹, variando de acordo com a etapa de preparação da amostra, dependendo do uso de soluções de cério e arsénio em concentrações e volumes diferentes e também quanto ao comprimento de onda em que a leitura é realizada. Os métodos variam ainda pela utilização de vários compostos contendo o Ce⁴⁺, no tempo e temperatura de leitura, na utilização de soluções para interromper a reação de oxirredução e na automatização dos procedimentos.

Ohashi et al (2000) testaram um novo método de digestão para amostras de urina com persulfato de potássio num sistema isolado de modo a evitar as perdas do analito. A análise foi realizada com solução de arsénio 0,05 mol L⁻¹, solução de cério 0,019 mol L⁻¹ e a solução da amostra digerida permaneceu por 30 min a 25 °C, tendo sido medida a absorvância a 405 nm e a curva de calibração registrada com o cálculo do logaritmo das absorvâncias pela concentração das soluções padrão de iodeto.

Trokhimenko & Zaitsev (2004) analisaram amostras de leite e ovos através do método de Sandell-Kolthoff. As amostras foram preparadas através de calcinação alcalina e na análise utilizou-se solução de arsênio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, ácido sulfúrico 8 mol L^{-1} , solução de cério a $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tendo sido misturados a 30°C . Após 5 min foi adicionada a solução do ácido difenilamina-4-sulfónico para parar a reação, tendo sido medida a absorvância a 750 nm num espectrofotómetro.

Este método tem baixo custo comparativamente com outras técnicas tais como cromatografia, ICP OES, ICP-MS, XRF. Possui como vantagens a agilidade na aquisição dos resultados, dificuldade de execução moderada e a utilização de equipamento popular e com grande aplicabilidade, em especial para análise de farmacos.

Exemplo de execução do método

Hedayati et al, 2011, para a determinação de iodo urinário pelo método de digestão por microondas prepararam as amostras usando três intensidades elétricas diferentes, baixa (80 W), média (440 W), e alta (800 W), em 5 momentos diferentes (5, 10, 15, 20 e 30 min). Depois de otimizar as condições para a digestão da amostra, foram adicionados 250 ml de amostra ou solução padrão a 750 mL de reagente de digestão e, seguidamente, incubadas num forno microondas doméstico a 440 W durante 10 min. Estas condições foram obtidas após otimizar o tempo para a digestão completa. Em seguida, 50 mL de cada amostra digerida foi transferida para os poços de poliestireno, numa microplaca de 96 poços. Seguidamente, 100 ml de solução de ácido arsénico e 50 mL de solução cérica foram adicionados a todos os poços, utilizando uma pipeta multicanal. Exatamente 15 depois, a absorvância da densidade óptica foi medida com um leitor ELISA a 405 nm. A validação do método foi efectuada avaliando a precisão, exactidão e a sensibilidade do mesmo. Os resultados deste estudo demonstraram que a aplicação de microondas utilizando 440 W num espaço de tempo curto (10 ') é adequada para preparar amostras de urina de forma a eliminar as substancias interferentes e libertar o iodo. O metodo de digestao convencional proposto por Dunn et al (1993) utilizava aquecimento electrico durante pelo menos 60 minutos. Ao usar

microondas na digestão da urina, reduz-se o tempo de preparação da amostra consideravelmente. No entanto, como aquecer as amostras ácidas é perigoso, diminuir o tempo de digestão resulta mais seguro em comparação com o método convencional. Tonacchera et al (2013) utilizou, num novo modelo profilático de consumo de vegetais fortificados com iodo, um método baseado no efeito catalítico de iodeto na reacção de oxidação-redução de Sandell-Kolthoff, após digestão de amostras com uma lâmpada ultravioleta. O sistema automatizado utilizado para determinação de iodo foi o Auto AnalyzerIII, como se pode ver na figura 8, tendo sido suficiente para detectar concentrações urinárias de iodo de 5,1 $\mu\text{g/L}$ / L.



Figura 8 : Auto AnalyzerIII (Seal Analytical, 2013)

2.1.2 Irradiação com activação do nucleó

2.1.2.1 Análise por activação de neutrões (NAA)

Princípio do método

A análise por ativação de neutrões (NAA) é um processo nuclear utilizado para determinar concentrações de elementos numa vasta gama de amostras, descentrando-se da sua forma química e centrando-se no seu núcleo. Este método, ao basear-se na activação de neutrões, requer uma fonte de neutrões. A amostra é bombardeada com neutrões de modo a formar isótopos radioactivos. A emissão e decaimento radioactivo de cada elemento é bem conhecido, tornando assim possível estudar os espectros das emissões da amostra radioactiva, e determinar as concentrações dos elementos nele contidos. A radioactividade resultante pode ser medida usando espectrometria gama em que os elementos são identificados e quantificados. Este método apresenta algumas vantagens: é um método não destrutivo, independente da matriz, permite a análise multi-elementar simultânea, pode analisar amostras sólidas e líquidas, requer uma preparação mínima da amostra, pode utilizar amostras de grande dimensão e os elementos orgânicos não representam qualquer interferência na análise. A preparação da amostra é simples. As amostras são pesadas ou pipetadas para frascos de polietileno ou quartzo, que são selados. Na maioria dos casos, a amostra é irradiada e analisada dentro do frasco, o que leva a que o risco de contaminação pelo manuseamento seja reduzido. (Fukushima & Chat, 2012)

O NAA também pode ser utilizado para determinar a actividade de uma amostra radioactiva. Se for realizado diretamente em amostras irradiadas é denominado análise instrumental de activação de neutrões. (INAA). Quando as amostras são irradiadas e submetidas a separação química para remover espécies interferentes ou para concentrar o radioisótopo de interesse, esta técnica é conhecida como análise radioquímica de activação de neutrões (RNAA). A exactidão do método é de aproximadamente 5%, e a precisão atinge valores inferiores a 0.1%. Existem algumas desvantagens para este método: apesar de esta técnica ser essencialmente não destrutiva, a amostra irradiada permanecerá radioactiva por muitos anos após a análise inicial, necessitando de

manuseamento e protocolos de eliminação radioactiva, assim como instalações de irradiação. Além disso elevado preço inerente ao processo é limitativo no acesso a esta técnica. Um reator típico utilizado neste método usa a fissão do urânio, proporcionando um alto fluxo de neutrões e maior sensibilidade. O tipo de neutrões gerados são de baixa energia cinética (KE), tipicamente inferior a 0,5 eV. Estes neutrões são denominados neutrões térmicos. Após a irradiação, um neutrão térmico interage com o núcleo alvo através de uma colisão não elástica, levando a captura de neutrões.

O Método derivado da análise por activação de neutrões, EINAA com o sistema de Supressão Compton (EINAA-CSS) é um método simples, rápido e de rotina que pode ser utilizado em pequenos reactores de pesquisa, onde o rácio termico/epitérmico é muito elevado. Uma das principais vantagens é que as amostras podem ser contadas directamente após a irradiação sem pré-tratamento adicional. Com este método consegue-se detectar níveis de iodo tão baixos como 20 ppb. (Fukushima & Chat, 2012)

Exemplo de execução do método

EINAA-CSS

Foram recolhidas 7 amostras de algas, (*Heterochordaria abientina*; *Hizikia fusiforme*; *Laminaria japonica*; *Undaria pinnatifida* Suringar; *Ulva*; *Gloiopeltis*; *Porphyra*). As amostras foram liofilizadas e pulverizadas utilizando um moinho previamente higienizado. Procedeu-se á separação da fibra dietética através do método AOAC. Foi incubado um grama de pó de alga seca, durante 15 minutos a 95°C com 0,1 ml de amilase (Sigma A3306) a pH 6. Seguidamente o pH foi ajustado para $7,5 \pm 0,2$, foi adicionado 0,1 ml de protease (Sigma p3910) e incubado 30 minutos a 60°C. Após arrefecimento ajustou-se o pH entre 4 e 4,6 e adicionou-se 0,1 ml de aminoglicosidase (Sigma A9913). Incubou-se durante mais 30 minutos a 60°C. Procedeu-se por fim a lavagens consecutivas do precipitado obtido com etanol a 78%, 95% e acetona. Por fim pesou-se, após liofilização. Colocaram-se 0.2 a 0.5 gramas de amostra por frasco, tendo sido selados de seguida. Foram preparados padrões de iodo para comparação com a amostra no método EINAA-CSS. Para avaliar a exactidão do método analítico abordado foi utilizado material de referência, material de referência padrão e material de referência certificado do mesmo modo que as amostras NIST SRM 1566a Oyster Tissue, NIST SRM 1549 Non-Fat Milk Powder, NIST RM 8415 Whole Egg Powder, e

NIES/NIRS CRM Typical Japanese Diet.

Foram irradiadas as amostras, os padrões de comparação, o material de referência, o material de referência padrão e o material de referência certificado durante 1 a 30 minutos no local pneumático externo, de cádmio blindado do reactor SLOWPOKE-2 da Universidade de Dalhousie, como se pode visualizar na figura 7, a um fluxo de neutrões de $5 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Depois de 3 minutos de arrefecimento, efectuaram uma contagem durante 5 a 30 minutos utilizando um sistema de espectometria de raios gama de supressão de Compton. Utilizaram-se os raios gama de 443-keV do iodo ^{128}I para ensaiar os níveis de iodo. (Fukushima & Chat, 2012). Obteve-se uma precisão próxima dos 94% aos níveis de iodo 2–5 mg/kg. Foi obtido um coeficiente de correlação de $r^2 = 0.9943$. Os limites de detecção do EINAA-CSS variam entre 0.017 and 0.053 μg , dependendo da natureza e da quantidade de substancias interferentes presentes nas amostras. O método EINAA-CSS que foi desenvolvido permite efectuar medições dos níveis de iodo entre 2 e 3,47 mg/kg com elevada precisão e exactidão (Fukushima & Chat, 2012).

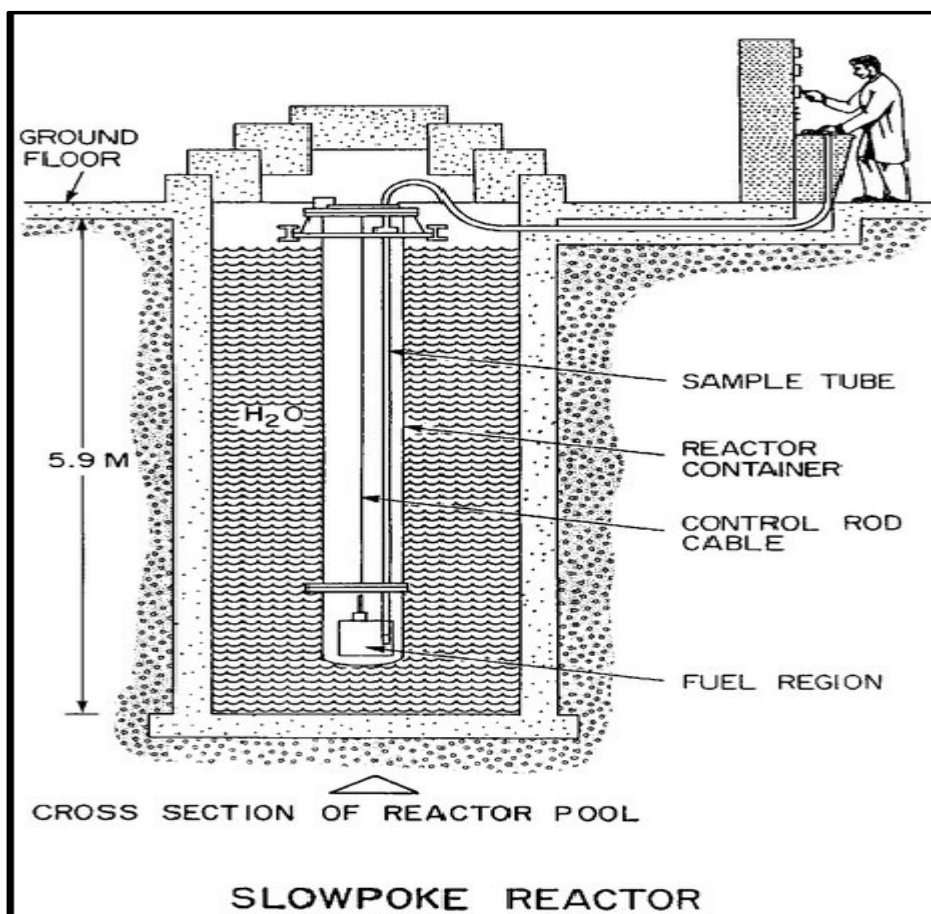


Figura 9: Reactor SLOWPOKE-2 da Universidade de Dalhousie

Isaac-Olive & Chatt (2012) analisaram o teor de iodo em 5 amostras de leites comerciais utilizando também o método EINAA- CSS. As amostras e os respectivos padrões foram também irradiados no reactor SLOWPOKE-2 da Universidade de Dalhousie com um fluxo de neutrões de $2.5 \times 10^{11} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Foram utilizados dois sistemas de detecção, um sistema de espectrometria de raios gama de supressão de Compton e um D-SPEC plus multi-channel analyzer em conjunto com um semiconductor de detecção Canberra 60 cm^3 Ge (Li). O objectivo foi determinar as espécies de iodo no leite bovino. Foi também utilizado um método inovador, o PC-EINAA-CSS, através do qual se conseguiu baixar o limite de detecção para $0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$, após 6 ciclos de irradiação/ contagem de decaimento. O melhoramento do limite de detecção através de um número de ciclos crescente no método PC-EINAA-CSS pode ser visto na figura 10

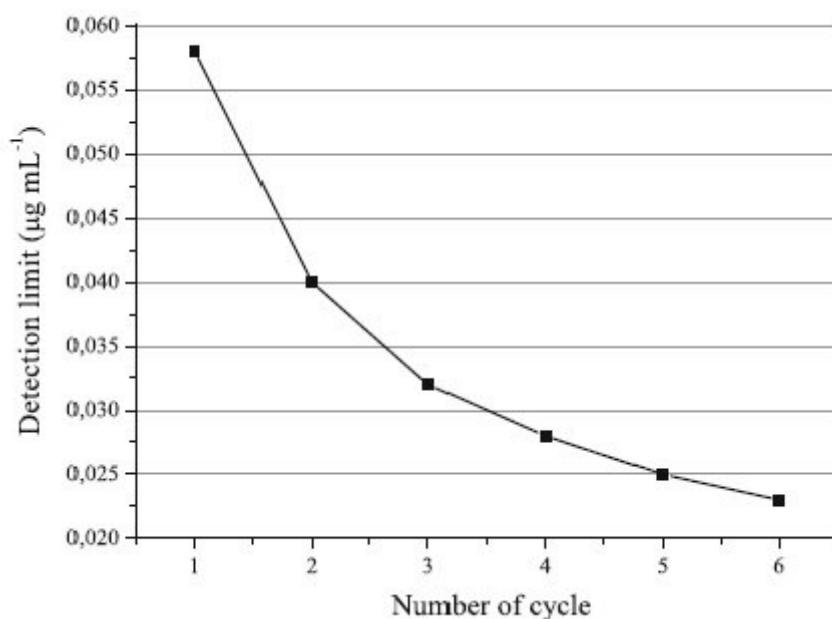


Figura 10: Melhoramento do limite de detecção com o número crescente de ciclos em PC-EINAA-CSS (Adaptado de Isaac-Olive & Chatt, 2012).

2.1.2.2 Análise de activação por partículas carregadas (CPAA)

Princípio do método

A análise de activação por partículas carregadas (CPAA) é frequentemente complementar ao NAA. A NAA tem menor sensibilidade para os elementos de número atómico baixo, contrariamente ao CPAA. Devido ao limitado poder de penetração das partículas carregadas na matéria, o CPAA necessita de uma amostra mais fina ou é usado para análise de superfície. Esta atenuação da radiação primária pela amostra leva a requisitos rigorosos na preparação da mesma. A análise por activação de prótons é uma técnica analítica bem conhecida útil para efectuar uma análise multielementar quantitativa e qualitativa, de elementos de várias dimensões, com ou sem separação química. A análise de activação por partículas carregadas (CPAA), devido à sua complexidade, tem predominantemente aplicação em elementos de número atómico mais baixo inacessíveis ao NAA. No entanto, após processos de optimização apropriados, o CPAA pode ser aplicado na determinação quantitativa de elementos de número atómico médio-pesado, em amostras biológicas. As amostras, que estão sob irradiação, habitualmente são pulverizadas. No caso de serem amostras biológicas, serão submetidas à liofilização. Este processo assegura a homogeneidade da amostra e facilita a dissolução, no caso da análise ser efectuada utilizando separação radioquímica de produtos de activação.

Exemplo de execução do método

O propósito deste trabalho foi demonstrar a possibilidade de utilizar a análise por activação de prótons como um método competitivo sobre outras técnicas analíticas aplicadas mais habitualmente para determinação de iodo em amostras biológicas. As amostras consistiram em fragmentos de tireóide humana, colhidas durante tratamentos a pacientes com diferentes tipos de tumor da tireóide, e foram mantidas a -20°C até ao momento da análise. As amostras foram pesadas e secas num secador a vácuo durante 2 dias, de modo a obter uma massa seca. Seguidamente foram homogeneizadas em agate mortar, transferidas para um frasco de polipropileno de 7 ml e pesadas de novo. A digestão das amostras e dos materiais certificados de referência foi efectuada utilizando 5 ml de potássio 3M ou hidróxido de lítio, em conjunto com a aplicação de limpeza ultra-sónica e vortex, antes da irradiação. Foi preparada uma solução padrão de trabalho com 1.0 µg de iodo (I-) por ml. Cinco ml desta solução foi utilizada como solução

padrão de comparação. A exactidão do método foi verificada pela análise de tecido de ostra (1566a e b) e alface do mar (BCR279), materiais certificados de referência. A separação radioquímica do berílio foi utilizada após a irradiação e baseada na cromatografia de troca iónica. As amostras digeridas foram neutralizadas pela adição de HNO_3 2M, e acidificadas a pH2 com 0,1M de HNO_3 . Estas amostras foram passadas através de uma coluna de troca catiónica de polietileno. Depois de carregada, a coluna foi lavada com 20 ml de HNO_3 4M para remover o berílio. (Wojcik, Zagrodzki, Mietelski & Was, 2012).

O AIC-144 isochronous cyclotron, que se pode visualizar na figura 11, consegue acelerar protões até uma energia de 60 MeV. As amostras e os padrões foram irradiados simultaneamente entre 2,5 a 5 horas. Uma corrente de feixe externo durante a irradiação estava na gama entre 25 e 40 nA. As medições foram efectuadas 13 horas depois do tempo de arrefecimento e duraram entre 1 a 8 horas. Neste estudo o espectro gama foi captado usando um sistema espectrométrico gama de nível ultra baixo que consistia num detector de germânio de elevada pureza (HPGe) com um crióstato de alumínio. O espectómetro foi calibrado utilizando uma fonte multiisotópica que tem as mesmas propriedades geométricas que as amostras avaliadas. (Wójcik et al, 2011)

Após a realização deste estudo confirmou-se que o feixe de protões utilizado era suficiente para obter ^{123}I a partir de ^{127}I . Devido à utilização de um feixe de electrões de energia superior ao usado normalmente em análise de activação de protões, conseguiu-se gerir o campo de radiação mista durante a irradiação. A determinação de iodo utilizando o método convencional PAA é limitado pela forte matriz radioactiva do ^7Be , de modo que foi necessário, após a irradiação efectuar uma separação pós irradiação de modo a eliminar estas interferências. O valor médio da concentração de iodo nas amostras foi de 0.590 ± 0.301 (SD) mg/g. A concentração de iodo na alface do mar, que foi utilizada como material de referência certificado para a validação deste método foi de 154 ± 13 mg/kg, que é muito próximo do valor tabelado (151 ± 6 mg/kg). A irradiação não poderá ser menor do que 2 horas enquanto o feixe de protões exceder os 25 nA. O efeito Compton do ^7Be é o factor perturbador principal da análise, mesmo quando se utiliza o sistema espectrométrico gama de nível ultra baixo, com o detector HPGe. O unico factor que pode diminuir a exactidão deste método é a perda de iodo durante os processos radioquímicos, quando a amostra é transferida entre 2 recipientes. As vantagens deste método são: as condições de irradiação necessárias não precisam de ser reproductíveis ou presuntivas como as amostras e padrões que são irradiadas

simultaneamente; o tempo de irradiação e arrefecimento são relativamente curtos o que conduz a uma taxa de transferência analítica satisfatória; a concentração de iodo obtida para CRM não demonstrou um viés considerável; o pré tratamento da amostra é relativamente curto e simples; o limite de detecção do iodo é suficientemente baixo (10^{-6} M) e garante medições fidedignas em tiróides; a análise instrumental por activação de prótons é suficiente para concentrações de iodo de 10^{-6} M. (Wójcik et al, 2011).

Como desvantagens, o problema principal é a interferência causada pelo ^7Be e a necessidade da utilização de separação radioquímica para a sua eliminação; o limite de detecção ainda é demasiado elevado para diferentes tipos de análises; a disponibilidade de material certificado contendo iodo é limitada. (Wójcik et al, 2011)

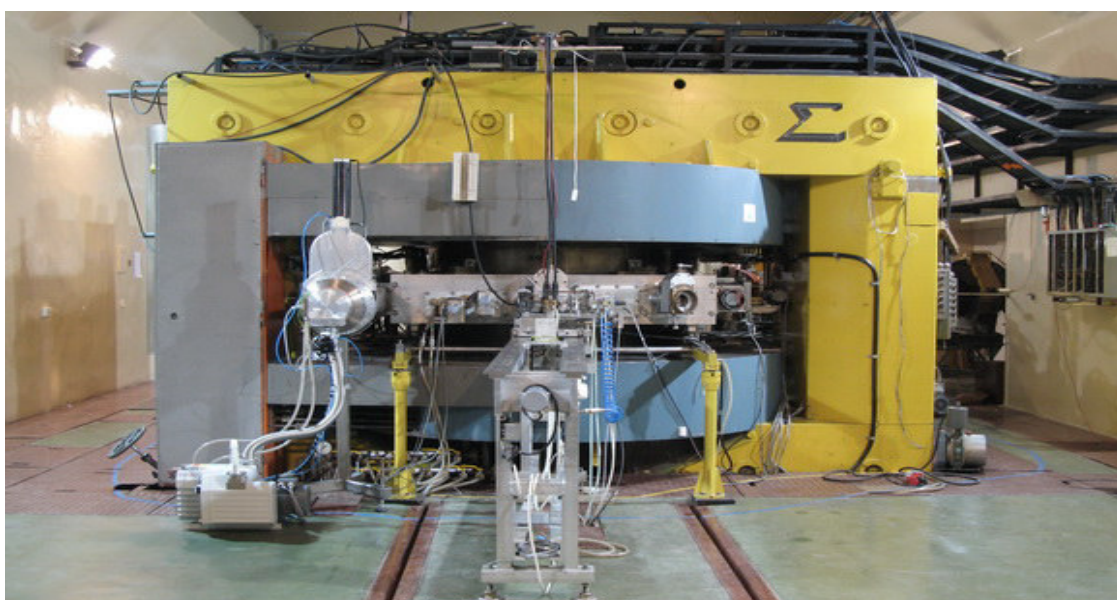


Figura 11: AIC-144 isochronous cyclotron (The Niewodniczan´ski Institute of Nuclear Physics Polish Academy of Science)

2.1.3 Cromatografia

2.1.3.1 Cromatografia gasosa

Princípio do método

A combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massa (GC-MS) é um método relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrometro de massas. (Kitson, Larsen & McEwen, 1996).

A GC-MS é composta por dois blocos principais: o cromatógrafo de fase gasosa e o espectrometro de massa. O cromatógrafo de fase gasosa utiliza uma coluna capilar que depende das dimensões da coluna (comprimento, diâmetro, espessura da película), bem como as propriedades de fase. A diferença nas propriedades químicas entre moléculas diferentes numa mistura e a sua afinidade relativa para a fase estacionária da coluna vai promover a separação das moléculas da amostra, á medida que se desloca ao longo da coluna. As moléculas são retidas pela coluna e seguidamente eluem a partir da coluna em tempos diferentes (tempo de retenção), e isto permite que o espectrómetro de massa capturar, ionizar, acelerar, desviar, e detectar as moléculas ionizadas separadamente. O espectrómetro de massa faz isso dividindo cada molécula em fragmentos ionizados e detectar estes fragmentos, utilizando a sua razão massa-carga. (Vékey, 2001)

Estes dois componentes, utilizados em conjunto, permitem um grau muito preciso de identificação de substâncias do que qualquer unidade utilizada separadamente. Não é possível fazer uma identificação precisa de uma molécula em particular por cromatografia em fase gasosa ou espectrometria de massa isoladamente. O processo de espectrometria de massa normalmente requer uma amostra muito pura, enquanto que a cromatografia em fase gasosa utilizando um detector tradicional (detector de ionização em chama) não consegue diferenciar entre várias moléculas que se deslocam ao mesmo tempo na coluna, isto é, têm o mesmo tempo de retenção, o que resulta em duas ou mais moléculas que co-eluem. Às vezes, duas moléculas diferentes, também pode ter um padrão semelhante de fragmentos ionizados em um espectrómetro de massa (espectro de massa). A combinação dos dois processos reduz a possibilidade de erro, uma vez que é extremamente improvável que duas moléculas diferentes que se comportam da mesma maneira em ambos, um cromatógrafo de gás e um espectrómetro de massa. Portanto,

quando um espectro de massa identificado aparece num tempo de retenção característico de uma análise por GC-MS, que normalmente aumenta a certeza de que o analito de interesse se encontra na amostra. Após as moléculas percorrerem o comprimento da coluna, passam através da linha de transferência e entram no espectrómetro de massa podendo ser ionizados por vários métodos, normalmente com apenas um método a ser utilizado num dado momento. Uma vez que a amostra é fragmentada será então detectada, geralmente por um diodo multiplicador de electrões, que, essencialmente, transforma o fragmento de massa ionizada num sinal eléctrico que é então detectado. Os métodos de ionização mais utilizados em cromatografia gasosa por espectrometria de massa são a ionização por impacto de electrões e a ionização química. (Amirav et al, 2008).

Exemplo de execução do método

Pang, Carpenter & Lewis, em 2015 realizaram um estudo utilizando uma técnica de derivação microfluida combinada com cromatografia gasosa com espectrometria de massa para medir iodo na sua forma gasosa (I₂). Obteve-se boa linearidade num intervalo entre 0,2-416 ppb e também baixos limites de detecção, que variaram entre 6 a 25 ppt para diferentes reagentes de derivatização, o que representa uma melhoria substancial face ao método espectrofotométrico utilizado anteriormente (o limite de detecção foi de 1.20 ppb). A técnica microfluida foi utilizada para quantificar I₂ produzido a partir das reacções heterogéneas da solução de iodeto de potássio e ozono, como se pode ver na figura 12.

Esta técnica pode eliminar laboriosos métodos de bancada para a preparação de amostras e utilizar a universalidade do instrumento analítico padronizado GC-MS, o qual pode permitir mais análises rotineiras de I₂ no ambiente. Estando os limites de detecção desta técnica próximos dos rácios de mistura troposféricos, esta poderá ser aplicada em medições ambientais, com um tempo de resolução iguam ou inferior a 30 minutos. (Pang et al, 2015)

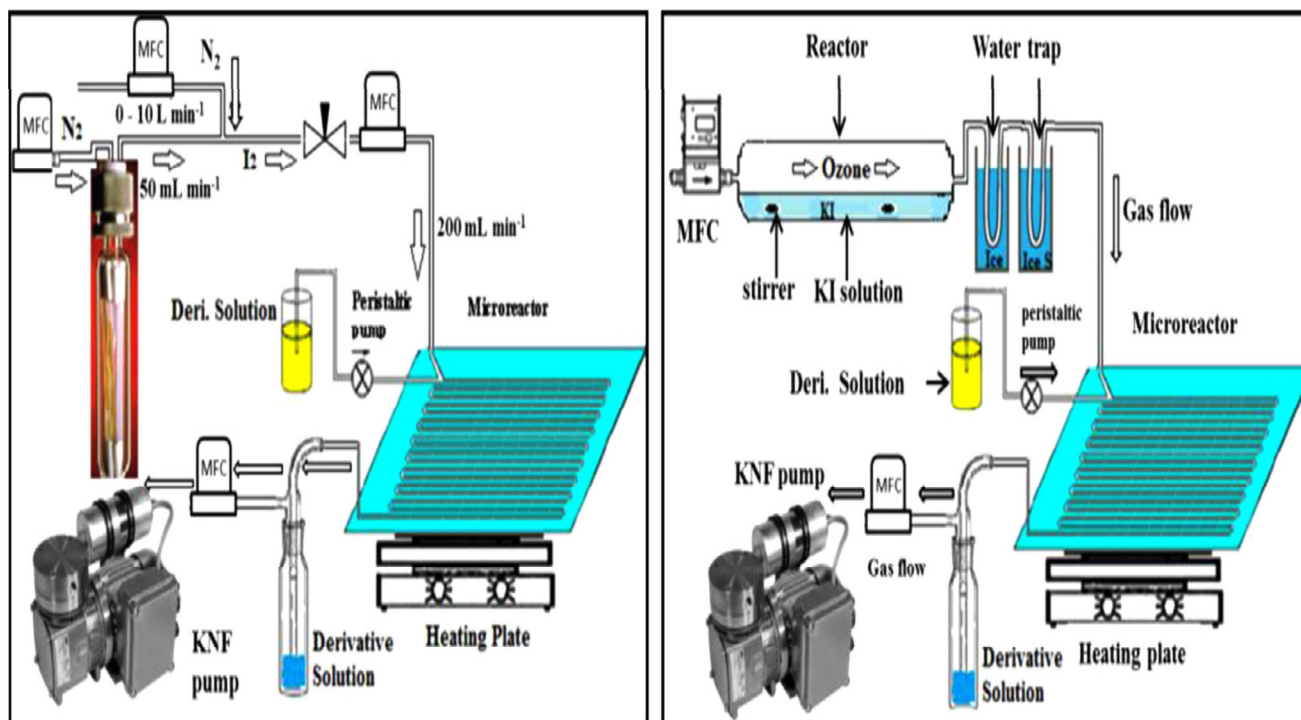


Figura 12 : Esquema do sistema de derivação microfluida (Pang, 2015)

2.1.3.2 Cromatografia iónica

Princípio do método

O método mais popular para a purificação de proteínas e outras moléculas carregadas é a cromatografia de troca iónica. Na cromatografia de troca catiónica as moléculas positivamente carregadas são atraídas a um suporte sólido carregado negativamente. Por outro lado, na cromatografia de troca aniónica, as moléculas carregadas negativamente são atraídas a um suporte sólido carregado positivamente. Para otimizar a ligação de todas as moléculas carregadas, a fase móvel é geralmente uma solução de condutividade média a baixa. A adsorção das moléculas para o suporte sólido é impulsionado pela interacção iónica entre os grupos iónicos de carga oposta na molécula da amostra e no ligando funcional no suporte. (Ito, 1999)

A força da interacção é determinada pelo número e localização das cargas na molécula e no grupo funcional. Ao aumentar a concentração de sal (geralmente por meio de um gradiente linear de sal) as moléculas com interacções iónicas mais fracas começar a eluir a partir da coluna em primeiro lugar. Moléculas que têm uma forte interacção iónica requerem uma concentração de sal mais elevado e eluem mais tarde no gradiente. As capacidades de ligação das resinas de troca iónica são geralmente bastante elevadas. Isto é de grande importância no processo de cromatografia de escala, mas não é crítica para separações analíticas de escala. Como regra geral, o pH do tampão de fase móvel deve estar entre o ponto isoeléctrico ou pKa da molécula carregada e do pKa do grupo carregado no suporte sólido. Tal como na maioria dos outros métodos de cromatografia, uma amostra de proteína é injectada na coluna sob condições onde irá ser fortemente retido. Um gradiente linear de concentração crescente de sal é então aplicado para eluir os componentes da amostra a partir da coluna. Uma alternativa à utilização de um gradiente linear é a utilização de um gradiente por passos. Isto requer equipamento menos complicado e pode ser muito eficaz para eluir diferentes fracções se as concentrações de sal adequadas forem conhecidas, geralmente a partir de gradientes lineares experimentais. (Weis, 2008). Muitos cromatógrafos também usam mudanças no pH para afetar uma separação. Na cromatografia de troca catiónica, aumentando o pH do tampão de fase móvel irá fazer com que a molécula se torne menos protonada, logo menos carregada positivamente. O resultado é que a proteína não pode formar uma ligação iónica com o suporte sólido carregado negativamente, o que finalmente resulta

na molécula a eluir da coluna. Na cromatografia de permuta aniónica, diminuir o pH do tampão de fase móvel irá fazer com que a molécula se torne mais protonada e portanto mais positivamente. O resultado é que a proteína não pode formar uma interacção iónica com o suporte sólido carregado positivamente que leva a molécula a eluir da coluna. (Skoog; Holler; Nieman, 2002)

Exemplo de execução do método

Shinoda et al, em 2011 utilizaram um método de cromatografia iónica associado a um processo de decomposição por pirohidrólise para efectuar a determinação de iodo em amostras de produtos alimentares. Para a determinação de iodo em produtos alimentares, a amostra biológica foi decomposta através de um processo de pirohidrólise. Foi recolhida uma alíquota da amostra e colocada num recipiente feito de mullitee, seguidamente foi colocada num tubo de quartzo e aquecido inicialmente a 100° C e foi-se gradualmente aumentando a temperatura até a 820° C, sob um fluxo de oxigénio molhado. O iodo presente na amostra foi separado por evaporação como iodeto de hidrogénio e recolhido numa solução de hidróxido de sódio diluído. Seguidamente procedeu-se á neutralização da solução básica que continha o analito por adição de ácido hidrocloreídrico. Procedeu-se á determinação de iodo através de cromatografia iónica, com absorção de detecção UV. Foram examinadas as condições sob as quais ocorreu a pirohidrólise. Os constituintes orgânicos da amostra foram totalmente decompostos, sob condições optimizadas, as espécies do analito foram todas convertidas ao ião iodeto. O limite de detecção de iodo foi de 0,01 µg-1, com uma reproductibilidade de 1,2% , utilizando uma amostra de 500 mg. Este método foi aplicado a materiais de referência certificados, tendo sido obtidos resultados satisfatórios. Sob condições óptimas de operação, a recuperação de iodo foi de 98% com um desvio padrão de 0,7%. As amostras utilizadas foram 5 tipos diferentes de farinha de arroz e 4 tipos de leite em pó. A decomposição por pirohidrólise com o uso de vapor de água e corrente de oxigénio e o aumento de temperatura gradual permitiu uma combustão suficiente destas amostras sem ser necessário adicionar reagentes de digestão ou utilizar catalizadores. Este método de decomposição poderá ser aplicável a outros métodos analíticos como o ICP-MS , devido a simplicidade da composição da solução obtida após este processo. (Shinoda et al, 2011)

2.1.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Princípio do método

A cromatografia líquida de alta eficiência, (HPLC) é uma extensão da cromatografia líquida clássica e caracteriza-se pelo uso de colunas de aço inox muito mais estreitas, com diâmetro interno de 2-5 mm, empacotadas com partículas de tamanho reduzido, 3-10 μm , que constituem a fase estacionária. A fase móvel circula sob alta pressão ao longo da coluna sob um fluxo controlado. A alta pressão permite análises mais rápidas e o uso de fases estacionárias constituídas por micro partículas permite uma elevada eficiência na separação. Esta técnica revelou-se um dos mais eficientes métodos cromatográficos, em virtude do desenvolvimento de instrumentação automatizada. Permitiu a injeção de volumes de amostra cada vez mais reduzidos e reproduzíveis e a detecção de quantidades de analito cada vez menores em sistemas de detecção em fluxo que indicam quando os componentes sofrem eluição da coluna. Esta técnica veio complementar a cromatografia gasosa (GC) no tipo de compostos que podem ser separados. Apresentou também como vantagem de tempos de retenção mais curtos e maior número de análises por unidade de tempo. A introdução de colunas capilares, como em cromatografia gasosa, oferece um maior número de pratos teóricos e uma melhor resolução do que as colunas padrão. Outra vantagem que esta técnica apresenta é a de utilizar menor quantidade de fase móvel, o que permite utilizar solventes tóxicos, raros, ou caros assim como o uso de fases estacionárias dispendiosas. Um sistema de HPLC consiste em quatro componentes principais: uma bomba, um sistema de injeção, uma coluna de separação e um detector, todos interligados numa instalação resistente a altas pressões, que podem ir até 300 atm. Em geral, a técnica de HPLC é um processo dinâmico onde as moléculas dos analitos se movem através de um enchimento poroso, por acção da fase móvel. Um detector de HPLC deve possuir os seguintes requisitos: Suficiente sensibilidade, limite de detecção suficientemente baixo, amplo intervalo dinâmico linear, suficiente estabilidade e reprodutibilidade do sinal, resposta do sensor rápida, ligação entre a coluna e o detector curta e directa e o detector deve ter um volume morto tão pequeno quanto possível.

Exemplo de execução do método

Nitschke & Stengel (2015) desenvolveram e validaram recentemente um novo método analítico para quantificar iodo como iodeto (I⁻), usando um sistema isocrático de HPLC com detecção UV. Como amostras foram utilizadas 19 espécies de macroalgas. As amostras foram liofilizadas e reduzidas a pó. A determinação do iodo total processou-se após uma incineração alcalina seca. Durante este procedimento todas as espécies de iodo orgânico e inorgânico são convertidas em I⁻ não volátil o que vai permitir a determinação das concentrações totais de iodo. Após a incineração as amostras foram reconstituídas em 2,5 ml água duplamente desionizada, vortexadas, seguidamente foi adicionado 2,5 ml de CH₃OH e novamente vortexadas. Os extractos foram filtrados antes da análise por HPLC. A separação cromatográfica foi efectuada utilizando um sistema HPLC (1200 Series). Determinaram a percentagem de recuperação de iodo a partir das amostras de algas com concentrações definidas de I⁻ e de IO₃⁻, antes da digestão, para examinar uma possível perda de iodo durante a preparação das amostras. A recuperação de I⁻ e IO₃⁻ foi muito boa e variou entre 92,6% e 108,9%. Além da recuperação, a exactidão determinada para o conteúdo de iodo nas macroalgas foi excelente. Os resultados obtidos pelo método de HPLC desenvolvido e um método de referência estabelecido num laboratório externo. A maioria dos valores estava dentro do intervalo de confiança de 95%. Foi desenvolvido neste trabalho um método simples e confiável para quantificar iodo como I⁻ utilizando um sistema de HPLC isocrático equipado com uma coluna cromatográfica baseada em sílica e um detector na zona do UV. Este método revelou-se específico para I⁻ e a quantificação deste anião foi precisa e exacta, com um limite de detecção de 0,2 ng µl⁻¹. Esta técnica é adequada para a determinação do conteúdo de iodo em macroalgas, após incineração alcalina seca.

O 2-iodobenzoato e N,N-dimetilanilina foram utilizados por Gupta et al (2011) para a conversão selectiva do iodeto para 4-iodo-N,N-dimetilanilina, o qual foi extraído por etanol, quando a fase de separação ocorreu por adição do sulfato de amónio, ocorreu um processo chamado microextração líquido-líquido assistido por sal (SALLME), e foi analisado por HPLC com detecção por arranjo de diodos. O iodo foi reduzido a iodeto por derivação. Este método foi optimizado para extração de solvente, sal para separação de fases e tempo de reacção. Foi obtida uma calibração linear para 10 µg-10 mg L⁻¹ de iodeto com um coeficiente de correlação de 0,9989 e um limite de detecção de 3,7 µg L⁻¹. As amostras de sal de mesa iodado revelaram-se muito pouco

homogéneas. O desvio padrão relativo das diferentes aliquotas analisadas variaram entre 18,0 a 78,1%. A recuperação média das amostras foi de 98,4%. O esquema de reacção proposto é uma conversão directa de iodeto em 4-iodo-N,N-dimetilanilina, que é rápida e não afectada pela presença de substâncias iónicas interferentes. Neste estudo foi demonstrado que o método SALLME é um método viável e sensível para a detecção de iodeto. Este método integra a amostragem, extracção e clarificação num único passo. Como vantagens ele apresenta uma separação de fases mais rápida, rápido equilíbrio de partição, menos toxicidade do solvente extractor e compatibilidade do extracto para análises posteriores. Além disso, este método beneficia da sua simplicidade, alta sensibilidade e liberdade dos efeitos de memória. (Gupta et al, 2011).

2.1.4 Electroforese capilar

Princípio do método

A electroforese capilar é uma técnica de separação em fase líquida que se baseia na migração diferencial de espécies iónicas ou ionizáveis quando as mesmas são submetidas a um campo eléctrico.

O princípio base, por detrás da técnica de electroforese é que as moléculas carregadas irão migrar em direcção ao polo oposto e separarem-se umas das outras, de acordo com as suas características físicas. A electroforese tradicional tinha dois factores limitantes que a condicionavam, a detecção de moléculas após a conclusão da separação electroforética e que apenas baixas voltagens poderiam ser usadas para prevenir danos pelo aquecimento das amostras. A electroforese capilar resolveu ambos os problemas, porque o tubo capilar tem um elevado rácio superfície/volume (25-100 μm de diâmetro), irradia calor prontamente e assim as amostras não sobreaquecem. A detecção das moléculas migradoras é acompanhada de uma fonte luminosa brilhante através de uma porção da tubagem e detectando a luz emitida a partir do outro lado. O tempo de execução das amostras é muito curto, graças à alta voltagem (10-30kV). (Anastos, Barnett, & Lewis, 2005).

Os tubos capilares podem ser preenchidos com várias matrizes diferentes, dependendo do tipo de amostra. As amostras são aplicadas nos tubos capilares quando o tampão cátodo é mudado de lado e a câmara da amostra é colocada na abertura do tubo capilar. Qualquer pressão é aplicada à amostra e 10 a 100 nL são injectados ou uma corrente eléctrica é aplicada através da amostra e apenas as moléculas carregadas entram no capilar. Uma vez que a separação electroforética esteja completa, o conteúdo do capilar é libertado e a matriz fresca preenche o tubo. Substituir a matriz no interior do capilar minimiza a possibilidade de contaminação das amostras entre análises. Um aspecto bastante importante da electroforese capilar é a simplicidade da instrumentação. A figura 13 esquematiza um equipamento de electroforese capilar, composto por uma fonte de alta tensão, capilares, normalmente de sílica fundida, eléctrodos, geralmente de platina, um detector apropriado e um computador para tratamento de dados. A electroforese capilar apresenta-se como técnica analítica complementar a cromatografia

líquida de alta eficiência e á cromatografia gasosa. Esta técnica oferece vantagens significativas sobre as técnicas cromatográficas pois requer um pequeno volume de amostra (poucos μl), pode utilizar detecção por absorção de luz ultravioleta em comprimentos menores do que 200 nm sem que haja aumento de ruído, além de permitir a análise de uma vasta gama de compostos, desde iões até macromoléculas, utilizando a mesma coluna capilar. O custo operacional é relativamente baixo devido ao reduzido consumo de solventes e o baixo custo das colunas capilares. (Anastos, Barnett, & Lewis, 2005).

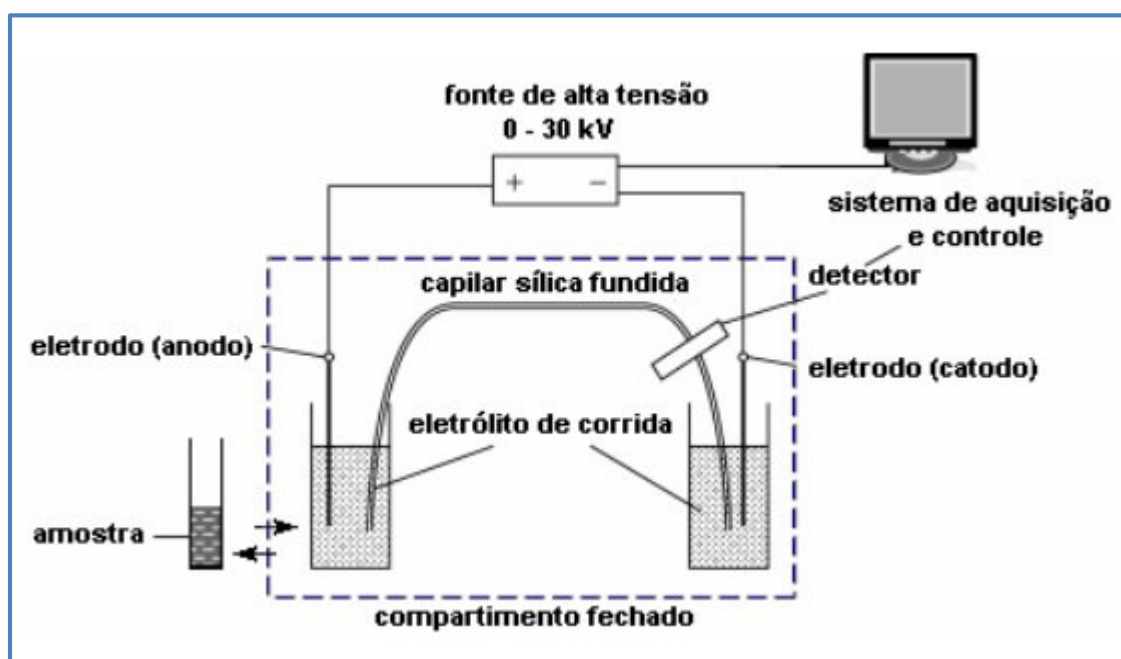


Figura 13: Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar

Exemplo de execução do método

Macedo et al, em 2014 desenvolveram um método simples mas selectivo para a análise de iodo em amostras de urina de volume reduzido, por electroforese capilar com detecção UV. Foi obtida uma excelente selectividade quando foi utilizado um electrólito de fundo ácido, composto por um anião de baixa mobilidade (dihidrogenofosfato) que actua como tampão e electrólito terminal, em conjunto com complexação dinâmica via α -cyclodextrin, num capilar de sílica fundida não modificado sob polaridade invertida. O auto-empilhamento das amostras foi desenvolvido como um novo metodo de pré concentração da amostra para aumentar a sensibilidade com limites de detecção submicromolares, incluído a determinação simultanea de nitrato e tiocianato como inibidores importantes da recaptção do iodo no ambiente, como se pode verificar na figura 14. Métodos rigorosos de validação confirmaram a boa linearidade ($R^2 = 0.9998$), boa exactidão (recuperação média de 93% em 3 níveis de concentração e precisão para a determinação fidedigna de iodeto em espécies de urina agrupadas ao longo de 29 dias de análises. (desvio padrão relativo de 11%). Verificou-se que com este método foi obtida uma excelente selectividade e sensibilidade, ao mesmo tempo que se usou um novo método de pré-concentração de amostra baseado no auto-empilhamento, que requer uma diluição simples. Este método utiliza a vantagem da elevada concentração salina nas espécies de urina, uma força iónica elevada/sistema tampão ácido de fosfato de lítio e um α -CD como aditivo para ajustar a mobilidade do iodeto, utilizando um capilar de sílica fundida, sob polaridade invertida. Rigorosos métodos de validação demonstraram uma exactidão aceitável, precisão intermédia e uma faixa dinâmica linear para classificar o iodeto urinário com boa estabilidade a longo termo, durante 5 semanas de análise contínua. A sensibilidade do ensaio de electroforese capilar com auto-empilhamento de amostra é comparável com os ensaios espectrofotométricos cinéticos ($LOQ=0.20-0.39 \mu M$), com uma boa precisão entre os dias do ensaio ($RSD \approx 10\%$). Os principais beneficios deste ensaio incluem a grande selectividade para a resolução do iodeto e permitir uma análise simultanea de nitrato e tiocianato, utilizando especies de urina de volume restrito a partir de biorepositórios, sem manutenção complicada. Este método também tolera grandes diferenças na condutividade da urina, que são corrigidas pela diluição apropriada ou pela mudança de matriz, se necessário. Os custos operacionais deste método são baixos, devido a utilização de pequenas quantidades de tampão aquoso e ao baixo preço dos reagentes,

com uma produtividade de cerca de 80 amostras por dia. Este método revela-se adequado e custo efectivo para a vigilância da insuficiência de iodo pelos órgãos de saúde pública. (Macedo et al, 2014)

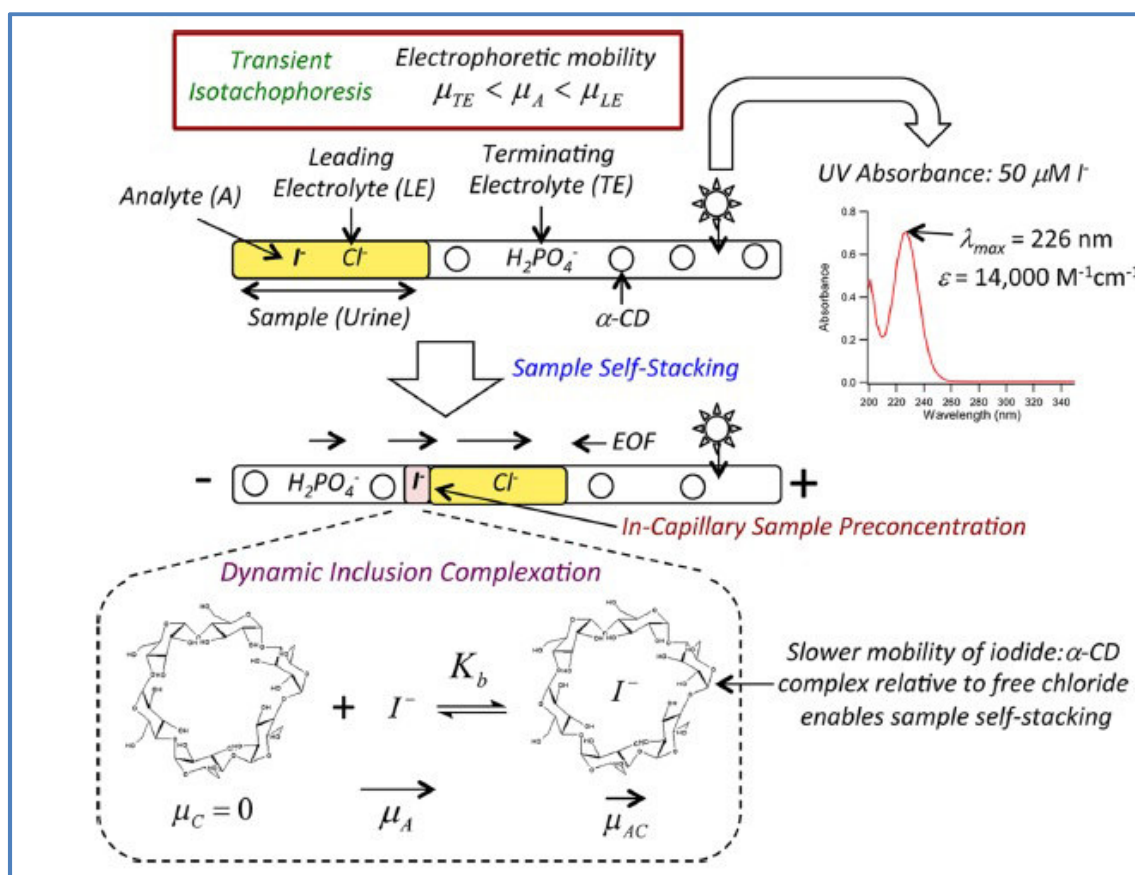


Figura 14: Condições da injeção e condições do tampão utilizados para a determinação do status de iodo por electroforese capilar, com detecção UV, com auto empilhamento da amostra. (Macedo et al, 2014)

2.1.5 Conversão ao estado atômico seguido de medida de emissão ou de absorção ou de massa

2.1.5.1 Espectroscopia de Absorção Atômica de Chama (FAAS)

Princípio do método

Os métodos por espectrometria de absorção atômica (AAS) foram propostos como uma alternativa para determinar os elementos não metálicos e espécies orgânicas uma vez que os detectores AAS, e acima de tudo FAAS estão disponíveis em muitos laboratórios de pesquisa, devido ao baixos custos do equipamento e manutenção e a simplicidade do processo. Os métodos indirectos de AAS para determinar iodo em leite e seus derivados baseiam-se em reacções de complexação e precipitação entre o iodo e um catião metálico que actua como reagente (mercúrio ou prata). Assim, o sinal do elemento marcador no detector AAS é proporcional à concentração de iodo na amostra. Estes métodos não são muito utilizados porque incluem processos de separação muito demorados (precipitação ou filtração por dissolução). Além disso, o processo de extracção requer o uso de solventes organicos tais como o isobutilmetilcetona, que é caro, prejudicial para o ambiente e para a saúde humana. O iodeto também pode ser precipitado com prata e dissolvido por uma solução de cianeto. (Yebra&Bollaín, 2010). Seguiram-se outros métodos derivados do AAS, que envolviam o iodeto de prata, outros ainda em que era apresentada a determinação sequencial de cloreto e iodeto dissolvendo sequencialmente os precipitados com amoníaco e cianeto respectivamente, e a determinação individual de iodeto, onde o iodeto de prata era dissolvido por uma solução de cianeto. Neste ultimo ensaio foi demonstrado que na presença de outros aniões tais como cloreto, brometo e fosfato a % de recuperação de iodeto é superior a 100%, como consequência de uma interferência positiva destes aniões.

A adição de um sistema de injeção em fluxo (FI) para AAS revelou ser um método eficiente para automatizar a preparação e análise da amostra, assim como para desenvolver métodos indirectos no âmbito desta técnica analítica. (Yebra& Bollaín, 2010) De modo a ultrapassar todos os problemas associados aos métodos anteriores, criou-se uma metodologia indireta para a determinação total de iodo no leite e amostras de formulações infantis, pelo método de Espectroscopia de Absorção Atômica de

Chama (FAAS). Este método utiliza o tiosulfato como solução de dissolução evitando o uso de cianeto tóxico, e eliminando a interferência de outros aniões que precipitam com prata, dado que se baseia na insolubilidade do iodeto de prata em amónia diluída. (Yebra& Bollaín, 2010)

Exemplo de execução do método

Preparação da amostra: calcinação alcalina: 0,25 g de amostra e 2 ml de solução de 2 mol-1 L de KOH (em etanol) e 2 mL de 0,4 mol L-1 Ca (NO3) 2 em solução etanolica. . A mistura secou-se numa estufa de secagem a 70 ° C durante 10 h e a 120 ° C durante 5 h. As misturas secas foram aquecidas numa mufla a 240 ° C durante 2 h, a 340 ° C durante 1 h, a 440 ° C durante 1 h, e a 500 ° C durante 4 h. O teor de cinzas foi dissolvido com água ultrapura, 1,3 ml de 1 mol de L-1 de Na2SO3, e 1 mL de 1 mole L-1 HNO3 e diluída até 10 ml com água ultrapura. O Espectofotometro de absorção atómica utilizado foi um Perkin-Elmer 5000. Utilizou-se um metodo de determinação indirecta, com o auxilio de uma lampada de prata, a 328.1 nm. O limite de detecção foi de aproximadamente 0.11 µg g-1. Ver tabela 8 (comparação com outros métodos utilizados) Em termos de exactidão estava 98,1% de acordo com os valores certificados. (Yebra& Bollaín, 2010)

Tabela 8: Comparação dos valores meritórios obtidos por FAAS relativamente a determinação de iodo em produtos lácteos, face a outros métodos conhecidos (Yebra& Bollaín, 2010)

Comparison of figures of merit of the present method with some previously reported for iodine determination in milk products.

Detection	DL (µg L ⁻¹)	Recovery (%)	RSD (%)	Reference
A	0.6	No data	1.68–3.03	[4]
ICE	0.5	98.1–102.2	6.2	[5]
ICSBW	5	97–105	3.9	[8]
GC-EC	0.11	No data	3.5–10.4	[9]
GC-MS	0.010–0.025	96.5–107.0	2.6–4.5	[12]
OS	94.4	100.6	1.38–2.83	[14]
NAA	0.06 µg g ⁻¹	No data	1–13	[16]
SP-C	0.99	94.5–105	5	[17]
IDA	5	No data	<14	[19]
ICP-OES	2 (40 µg g ⁻¹) 7 (280 µg g ⁻¹)	85–98	2–3	[21]
VG-ICP-OES	20	94–102	0.5–3.5	[22]
ICP-MS	0.001–0.002	97–98	3–4	[25]
ICP-MS	7 × 10 ⁻⁷ µg g ⁻¹	No data	7–15	[27]
ETAAS	3.7	98.1	<10	[28]
ETAAS	2.4	97.5–100.6	16.9	[29]
ETAAS	1.2 (3.1 µg g ⁻¹)	100	0.6–12.3	[30]
FAAS	2.75 (0.11 µg g ⁻¹)	98.1	1.3–6.8	Present method

A: amperometry; DL: detection limit; ETAAS: electrothermal atomic absorption spectrometry; FAAS: flame atomic absorption spectrometry; GC-EC: gas chromatography with electron capture detection; GC-MS: gas chromatography–mass spectrometry; ICE: ion chromatography-electrothermal detection; ICP-OES: inductively coupled plasma optical emission spectrometry; ICP-MS: inductively coupled plasma-mass spectrometry; ICSBW: ion chromatography with series bulk acoustic wave detection; IDA: isotope dilution analysis; NAA: neutron activation analysis; OD: optical sensor; SP-C: spectrophotometric catalytic; VG-ICP-OES: vapour generation inductively coupled plasma optical emission spectrometry.

2.1.5.2 Espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

Princípio do método

O ICP-MS é uma ferramenta poderosa para analisar elementos de traço em amostras ambientais (figura 16). Um vasto numero de elementos pode ser analisado utilizando ICP-MS, como se pode ver na figura 15. O sistema ICP-MS pode medir quantitativamente os elementos e revelar a quantidade total do mesmo na amostra. Os benefícios deste método face a outros métodos de ionização, como a ionização por chama, é que a ionização ocorre num meio quimicamente inerte, onde a ionização é mais completa, prevenindo a formação de óxidos. Além disso o perfil de temperatura da tocha é relativamente uniforme, reduzindo o efeito de auto absorção. As curvas de calibração linear são observadas sob diversas ordens de magnitude para o processo de ionização. O processo no qual a análise de ICP-MS ocorre, divide-se em 4 etapas, introdução da amostra, tocha de ICP, interface e espectrometria de massa. Na introdução da amostra, existem vários modos para introduzir a amostra, dependendo das características físicas da mesma. (geração de hidretos, vaporização electrotermal, injeção de fluxo, entre outros). Todos os métodos de introdução da amostra têm um objectivo comum, varrer a amostra para a tocha de Icp, na forma gasosa ou de aerossol para análise. As amostras mais comuns em ICP-MS são líquidas. Estas amostras requerem nebulização. São bombeadas a partir de um tubo através de uma bomba peristáltica, para o nebulizador. Vão formar-se gotículas na ponta da agulha, onde irão ser nebulizadas, por acção de um fluxo de argon perpendicular á agulha da amostra. Uma pequena quantidade de aerossol é varrida para a tocha, mas a maioria da amostra perde-se por condensação. Para uma amostra sólida é necessário utilizar vaporização electrotermal. Um dos aspectos fundamentais na análise ICP-MS é que os elementos vão ser detectados e quantificados na totalidade, não ocorrendo separação de elementos contendo o elemento de interesse. No entanto, pode existir uma separação prévia por técnicas cromatográficas.

A tocha de ICP consiste numa bobina de indução de cobre enrolada a volta de uma estrutura concêntrica de quartzo. O gás argon está sempre a fluir através da tocha de quartzo e um gerador de radiofrequência confere energia a bobina, a frequências de oscilação. A geração de plasma ocorre quando o argon é estimulado com uma faísca da unidade de Tesla. A faísca ioniza algum argon e os cátions e electrões produzidos aceleram em direcção á bobina de radiofrequência. Os cátions e electrões colidem com

outras moléculas de argon, criando altas temperaturas. Com um amplo fluxo de argon, o plasma irá atingir o equilíbrio e permanecer a uma temperatura constante de 6000° C durante a análise. O aerosol produzido por nebulização entra no plasma de elevada temperatura, ocorrendo atomização. Estes átomos continuarão a viajar através do plasma, absorvendo energia até perderem um electrão, e se tornarem ionizados.

Os novos iões saem da tocha e chegam á interface. Aqui, é o ponto onde a amostra proveniente da porção do ICP é introduzida no espectrometro de massa, fazendo a ligação entre ambos. O primeiro elemento que a amostra proveniente do ICP, após ionização encontra é o cone de amostragem. Este cone arrefecido tem um pequeno orifício, permitindo ao gás plasma quente entrar na câmara de despressurização. Nesta câmara ocorre arrefecimento rápido e rápida expansão do gás. Parte deste gás atravessa o cone de skimmer para uma câmara mantida a vácuo. Estas duas etapas permitem a redução da pressão do gás iónico para entrar no espectrometro de massa a temperatura e pressão adequadas.

Após passar através dos cones de amostragem e de skimmer, o fluxo iónico foca-se na região do quadropolo. Os iões gerados no plasma são quase todos carregados positivamente e têm a tendência a se repelirem entre si. Eles vão passar através de um cilindro metálico carregado que impede o feixe iónico de divergir.

O ICP-MS (figura 16) está equipado com uma célula de reacção dinâmica (DRC). Esta localiza-se na câmara de vácuo, entre a lente e o quadropolo. A modificação química do feixe iónico elimina as interferências no DRC. A espectrometria de massa é utilizada para fornecer informação acerca da composição elementar das amostras, a estrutura das moléculas, a composição qualitativa e quantitativa das misturas complexas e os rácios isotópicos de átomos nas amostras. Os iões são dispersos no analisador de massa, com base no seu rácio massa/carga. O quadropolo de espectrometria de massa é o espectrometro de massa mais comum em espectrometria atómica de massa. Este é constituído por quatro varetas cilíndricas paralelas que servem de electrodos. O quadropolo é um filtro de massa que unicamente permite aos iões terem um intervalo limitado de rácio massa/carga para atingir o transdutor. Os iões que saem do analisador de massa entram no detector. Os iões que saem do quadropolo produzem um sinal amplificado que é processado e enviado para o computador para processamento de dados



Figura 15: Elementos detectáveis por análise de ICP-MS (Skoog Holler, & Crouch, 2007)



Figura 16 : Icp-MS, modelo X Series II

Exemplo de execução do método

Barbosa et al, em 2013 determinaram o teor de iodo, bromo e cloro em soja, através do método ICP-MS, com digestão por combustão por microondas. Utilizando este processo de digestão, a concordância com os valores dos materiais certificados de referência e as percentagens de recuperação foram superiores a 95% para todos os analitos. O conteúdo de carbono residual após a digestão aplicada foi inferior a 0.5%, devido aos 1400°C utilizados na combustão. Os limites de detecção foram respectivamente 0,03, 1,2 e 0,002 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o bromo, cloro e iodo respectivamente. Este tipo de digestão permitiu processar 8 amostras de cada vez, em 25 minutos, o que demonstra que este método é bastante apropriado para futuras determinações de rotina de bromo, cloro e iodo por ICP-MS.

Romaris-Hortas et al, em 2012 utilizaram um novo método de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RPC) com troca aniônica (AEC), com ICP-MS para determinar 4 espécies de iodo, iodeto, iodato, MIT e DIT, a partir de amostras de algas e também espécies de bromo. O uso de RPC e AEC em conjunto com ICP-MS permitiu a separação de diferentes espécies de iodo e bromo inorgânico, num único ensaio cromatográfico. O Brometo foi encontrado em todas as espécies de algas, mas o iodeto esteve sempre em níveis indetectáveis. O MIT esteve presente na maioria das amostras enquanto que o DIT só foi encontrado em duas amostras. Foram encontradas espécies desconhecidas de iodo e bromo nas amostras de algas. Considera-se necessário um novo trabalho para perceber a estrutura das espécies desconhecidas de iodo e bromo presentes nas amostras.

Han et al, em 2012, utilizaram um método de determinação de espécies de iodo em algas e amostras de água utilizando cromatografia líquida de alta eficiência de fase inversa de par iónico associada com ICP-MS (RP-HPLC-ICP-MS). Foram identificadas duas espécies inorgânicas de iodo I⁻ e IO₃⁻ e dois aminoácidos iodinados, MIT e DIT. Os limites de detecção para I⁻, IO₃⁻, MIT e DIT foram 0.061, 0.052, 0.079 and 0.24 mg L^{-1} , respectivamente. Sob condições optimizadas o método proposto foi aplicado com sucesso na especiação de iodo em espécies de algas e amostras de água do mar. As recuperações para I⁻, IO₃⁻, MIT e DIT nas amostras de algas e água do mar variaram entre os 90 and 110%. Este método revelou-se altamente sensível, amigável ao ambiente,

rápido, que são benéficos para análises de rotina na especiação do iodo no ambiente e em alimentos. A eficiência de extracção foi menos de metade para uma extracção de longa duração (4h). Futuramente será investigado um novo método de extracção assistida por microondas de alta eficiencia.

Sun et al, em 2010, utilizou o método de ICP-MS para determinar a presença de bromo e iodo em partículas atmosféricas e no carvão, pois estes compostos provocam a destruição do ozono na atmosfera, daí requererem maior atenção.

As amostras foram dissolvidas em 5 mL de misturas de HNO₃ e 2 mL de H₂O₂ num forno de digestão por microondas de alta pressão. A solução foi, em seguida, oxidada por persulfato (Na₂S₂O₈), além de uma pequena quantidade de nitrato de prata. Por fim foi feita a determinação por ICP-MS em simultâneo.

Os limites de detecção para bromo e iodo usando este método foram de 3.2 µg/L e 1.1 µg/L respectivamente. Os desvios padrões relativos variaram de 4,3% a 9,7%, e de 1,5% a 3,4% para o bromo e iodo, respectivamente. A efectividade e a sensibilidade do método foram melhoradas pela adição da solução de persulfato como agente oxidante. O carvão e as partículas de aerosol das 4 estações do ano foram digeridas e tratadas num digestor de alta pressão por microondas e os níveis de bromo e iodo foram determinados, sem necessidade de pré filtração. Os elevados efeitos de memória do bromo e do iodo foram reduzidos pela adição do novo agente de lavagem, solução álcool/ácido a 2%. Este método apresentou boa precisão e exactidão, assim como um baixo limite de detecção.

Michalke & Witte, em 2014 efectuaram a caracterização de um método para biomonotorização do iodo na urina e no soro baseado no método de espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado com cromatografia iónica. Devido á deficiência de iodo generalizada, ou a alguns casos de sobre exposição, biomonotorizar o iodo no soro é importante, até para avaliar o aporte de I- para a tiroide. Este método foi adicionalmente desenvolvido para ter um tempo de análise curto (8 min), para aumento da produção de amostras, boa precisão em medições em série (soro: 4,86%; urina: 1,4%), elevada exactidão (105% no soro e 101% na urina) e boa recuperação (102% no soro e 99% na urina). Também se está a investigar se a padronização interna durante a cromatografia, se a preparação de amostras para remoção da matriz de proteínas ou se a calibração das matrizes emparelhadas é vantajosa para o desempenho analítico. Por fim, os limites de detecção de 0.12 µg/L ou 0.05 µg/L (soro ou urina) e o

limite de quantificação de 0.39 µg/L or 0.17 µg/L (soro ou urina) foram encontrados. O método permite alta taxa de transferência de amostras e alcançam as figuras de mérito que são facilmente suficientes para determinar com exactidão o iodeto em ambas as matrizes de amostras. Além disso apresenta valores de recuperação e de precisão em torno de 100%. Uma descoberta importante é a necessidade de calibração da matriz de correspondência. A remoção de proteínas nas amostras de soro pelo EtOH a 30% melhorou as medidas de precisão. Com o método descrito aqui poderá efectuar-se uma rápida e exacta biomonitorização de I- em cenários de deficiência de iodo ou em casos de superexposição.

2.1.5.3 Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)

Princípio do método

Este método utiliza a radiação eletromagnética que é emitida pelos átomos, de modo a obter informação qualitativa, comprimento da radiação emitida, ou quantitativa, a quantidade de radiação eletromagnética que é emitida. A amostra líquida é introduzida no nebulizador onde é convertida em aerossol. De seguida os aerossóis formados, sofrem dessolvatação e volatilização, isto é, a água é extraída e os aerossóis são transformados em gases. Na tocha ocorre a atomização do vapor atômico causada pela temperatura do plasma. Após a excitação dos átomos ocorre o decaimento dos eletrões para níveis inferiores de energia (Manning & Grow, 1997). As radiações emitidas são separadas e detetadas por um sistema óptico que por sua vez transmite o sinal para um computador. Existem diferentes técnicas de introdução da amostra no plasma, como por exemplo, a vaporização eletrotérmica, injeção em fluxo, de geração de hidretos, nebulizador de alta pressão entre outros. (Boss & Fredeen, 2004)

Apesar do ICP-OES conseguir analisar amostras no estado líquido, sólido ou gasoso, as análises das amostras líquidas são mais frequentes. A injeção de líquido diretamente para o plasma, leva frequentemente à extinção do plasma ou a dessolvatação inapropriado do átomo com a diminuição da eficiência de emissão. A introdução das amostras é efetuada sob a forma de aerossol. Na formação deste no nebulizador, existem factores que vão influenciar a intensidade do sinal, tais como o tamanho, a uniformidade, a distribuição e a quantidade das partículas da solução. Os nebulizadores mais frequentes usados no ICP-AES são os pneumáticos e os ultrasónicos. Os ultrasónicos têm como vantagem a produção de aerossóis, com partículas de tamanhos mais uniformes e densidade mais elevada, o que permite um limite de deteção menor. Nos nebulizadores pneumáticos a densidade do aerossol é mais baixa e as partículas formadas tendem a serem maiores e menos homogêneas.

O plasma é formado numa tocha de quartzo através da aplicação de um campo eletromagnético originado por uma fonte de radiofrequência ao fluxo de gás. Os eletrões

livres formados no campo eletromagnético vão colidir com outros átomos de argon levando a uma reação em cadeia na formação de argon iónico, atómico e iões livres.

O Plasma é constituído por um gás raro parcialmente ionizável, onde coexistem electrões livres e iões positivos. Um dos gases raros usado para a formação do plasma é o argon, que apresenta a vantagem de ter uma menor energia de dissociação, ser monoatómico e quimicamente inerte.

A tocha mais comumente usada em ICP-OES, baseia-se num tubo circular de quartzo com três entradas de gás de argon: auxiliar, nebulizador e principal. O fluxo de gás principal, o argon do plasma, é introduzido tangencialmente com um fluxo entre 8 a 20 l min⁻¹. O gás auxiliar transporta a amostra até a parte central do tubo e tem um fluxo tangencial de 0,5-3 l/min-1. Este gás é responsável pela estabilização do plasma. O fluxo de gás do nebulizador flui do nebulizador até à câmara de nebulização levando o aerossol ao centro do plasma e tem um padrão de fluxo de aproximadamente 0,1 a 1,0 L/min-1. O ICP-AES apresenta algumas vantagens em relação às outras técnicas como, por exemplo, a espectrometria de absorção atómica de chama (F-AAS), pois permite análises multi elementares de diferentes amostras, nas mesmas condições de operação, num curto período de tempo e com limites de deteção da ordem de µg L⁻¹. Além disso apresenta também como vantagem a elevada repetibilidade de medição e ausência de interferências interelementares. Como contrapartida, o custo económico associado ao ICP-AES é muito mais dispendioso em relação FAAS e outros métodos similares, face ao consumo elevado de argon. Também é um método pouco adequado na determinação de elementos voláteis. Outra desvantagem prende-se com o facto de, como o número de comprimentos de onda de emissão aumenta, em consequência da emissão de vários elementos diferentes ao mesmo tempo, a probabilidade para a ocorrência de interferências, a partir de linhas espectrais que são muito próximos do comprimento de onda do analito também irá aumentar.

Exemplo de execução do método

O principal objetivo deste estudo foi avaliar, pela primeira vez, o desempenho de um sistema microcapilar compacto de modo triplo, com nebulizador ultrasónico de microfluxo contínuo (m-USN/TCS) para operar de forma estável com baixos fluxos de líquidos para a geração de vapor em ICP-OES. O iodo é gerado *in situ*, tomando

vantagem da rápida geração de vapor de iodo e da rápida separação do vapor a partir da fase líquida, determinada por espectrometria de plasma acoplado indutivamente. As amostras foram preparadas por solubilização com hidróxido de tetrametilamónio (TMAH), que permite a solubilização completa da amostra e reduz o risco de evaporação do iodo, antes deste ser quantificado por USN-VG-ICP-OES. O objectivo foi desenvolver esta técnica para determinar iodo em amostras biológicas, utilizando um nebulizador ultrasónico com geração de vapor, associado a ICP-OES.(Matusiewicz & Slachcinski, 2010).

Com esta finalidade foi avaliado o potencial analítico de um sistema microcapilar compacto de modo triplo, com nebulizador ultrasónico de microfluxo contínuo (m-USN/TCS) para a determinação de iodo em amostras biológicas por espectrometria de emissão óptica de plasma acoplado por geração de vapor indutivo. Foi seleccionada a linha de emissão atómica do iodo a 183.038 nm, como linha analítica de interesse. Foi obtido um tempo de reacção de oxidação extremamente curto entre a amostra, o ácido e o oxidante, e uma rápida separação dos produtos de reacção foi obtida pela mistura da amostra com o ácido sulfúrico, o peróxido de hidrogénio e a solução de nitrito de sódio, no oscilador de quartzo, convertendo os líquidos em aerossóis à entrada da câmara de pulverização. Foi efectuada uma abordagem univariada e um processo de optimização simples, derivando dos processos analíticos de mérito. Os resultados demonstraram que o desempenho analítico do sistema em estudo era superior ao do nebulizador pneumático. O desempenho analítico do sistema de nebulização ultrasónica foi caracterizado pela determinação dos limites de detecção e precisão com o método m-USN/TCS-VG-ICP-OES (ver figura 17) observada a uma taxa de fluxo de 15 µl/min-1. Os limites de detecção da concentração experimental para a determinação de iodo, calculados como a concentração, que forneceram um sinal igual a três vezes o desvio padrão da amostra foram 1.6 ng mL⁻¹ para o iodo. O método oferece boa precisão (2 a 4 %) para a análise de amostras líquidas e capacidade de microamostragem. As amostras foram preparadas por solubilização com hidróxido de tetrametilamónio, que permite a completa solubilização da amostra e reduz grandemente a evaporação do iodo, antes deste ser quantificado por USN-VG-ICP-OES. A exactidão do método foi verificada com recurso a materiais certificados de referência (NIST 1549 e NIST 1566b), utilizando uma técnica simples de calibração. Os valores medidos dos elementos nos materiais de referência estavam de acordo com os valores certificados. O

método foi aplicado para a determinação de iodo total em diferentes amostras orgânicas, leite em pó, sal iodizado, água mineral e comprimido de suplementação de iodo, revelando resultados satisfatórios. (Matusiewicz & Slachcinski, 2010)

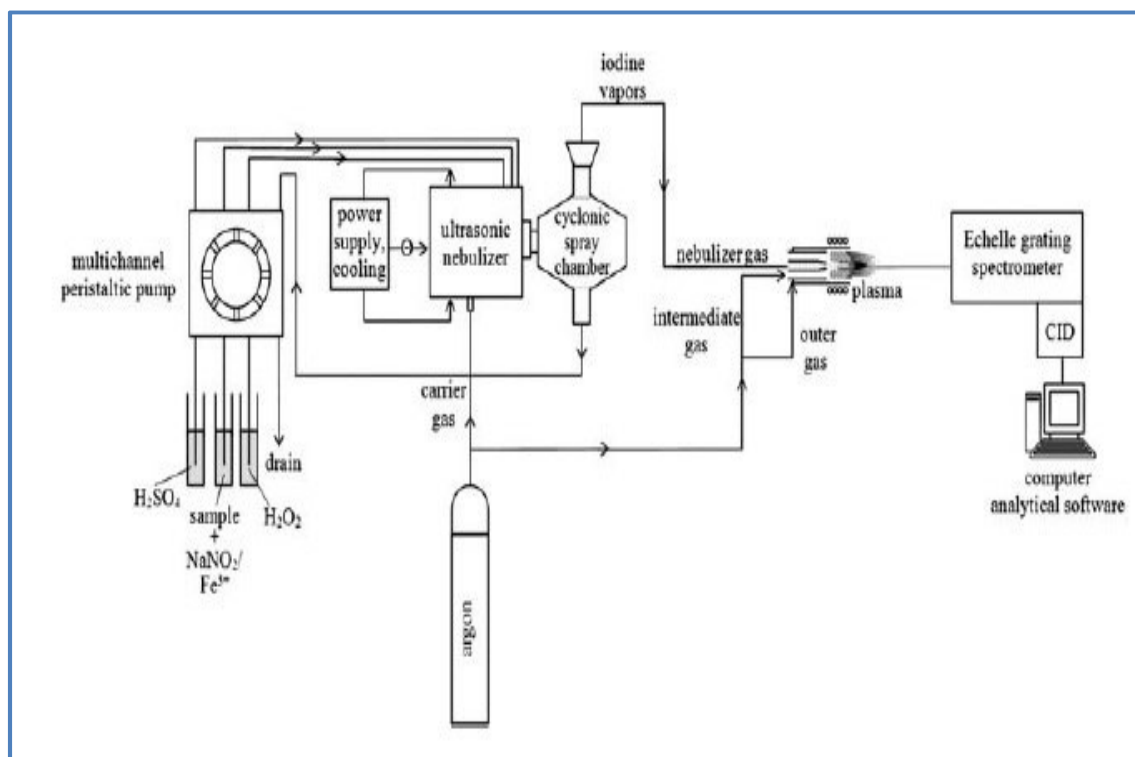


Figura 17: Diagrama esquemático do sistema m-USN/TCS-VG-ICP-OES (Matusiewicz & Slachcinski, 2010)

2.1.6 Raios-X

2.1.6.1 Fluorescência de raio-X (XRF)

Princípio do método

A fluorescência é um tipo de luminescência. Ou seja, quando uma substância é influenciada por um processo térmico, para emitir radiação eletromagnética. Normalmente, a emissão ocorre quando a substância vai desde o estado de energia excitado de volta para o estado fundamental. Se isso ocorre de imediato, dentro de um intervalo de tempo de 8/10 segundos ou menos a partir do momento em que é iniciado, é considerado como fluorescência. No caso de luminescência contínua, embora a causa da influência tenha sido removida, poderá chamar-se de fluorescência retardada, ou fosforescência se também corresponde á luz de maior comprimento de onda. A idéia do método XRF é levar o elemento em estudo á fluorescência, onde tanto a ativação como o quantum de luz emitida, ou o fóton, se encontram no espectro de energia dos raios-X. De acordo com o modelo de Bohr de um átomo, os electrões que rodeiam o núcleo estão confinados a órbitas diferentes, em níveis de energia discretos, conhecidos como K, L, M, entre outros. Os electrões na camada K estão mais próximos do núcleo, e também são os mais fortemente ligados. Quando um átomo absorve um fóton incidente que tem uma energia que excede a energia de ligação do electrão, pode resultar na emissão de uma fotoelectrão desse nível de energia do átomo. Este processo de absorção fotoelétrica deixa espaço livre no escudo de electrões, que vai ser imediatamente preenchido por outro electrão, geralmente proveniente de uma camada externa e, conseqüentemente, menos fortemente ligada, originando um rearranjo subsequente de electrões das camadas. Como será libertada energia quando a vaga for preenchida, pode ser emitida como radiação eletromagnética (fóton) ou ser transferida para um electrão de menor energia de ligação (eléctrões Auger) vinculativo que é ejectado a partir do átomo. A probabilidade de ter fótons emitidos é representada pelo rendimento da fluorescência. Os fótons emitidos terão uma energia que representa a diferença entre os níveis de energia discreta das camadas envolvidas. Estas energias emitidas de raios-X são características do elemento envolvido, permitindo a sua identificação. Outro elemento terá um conjunto diferente de raios X característicos. Se a vaga for criada no nível K as energias emitidas associadas serão $K\alpha$ e $K\beta$. Quando os raios X característicos como estes são capturados por um detector e as energias identificadas, ele irá revelar a

presença do elemento. O número de fótons detectados será proporcional à concentração do elemento no volume medido. Dependendo de qual elemento a pesquisar, existem sempre preocupações, como por exemplo, o tipo de fonte de raios-X e o tipo de detecção, o local de medição e a geometria do equipamento. A fonte em XRF ou é um tubo de raios-X ou um radionuclídeo. (Takeda et al, 2011)

A XRF tem sido largamente utilizada para a análise de elementos principais e traços em amostras de alimentos, plantas, amostras de solo e outras amostras ambientais. (Orescanin et al, 2008).

A configuração básica para todos os espectrometros xrf é uma fonte, uma amostra e um sistema de detecção. A produção de informação útil depende da separação ou dispersão do espectro de radiação proveniente da amostra de modo a que os raios-x característicos possam ser identificados e contados. Isto pode ser feito de dois modos, por XRF com dispersão de comprimento de onda (WDXRF), que utiliza um cristal para dispersar os espectros ou por XRF de dispersão de energia (EDXRF), que determina directamente as energias dos diferentes raios-X no espectro. Neste método, (EDXRF), com uma geometria cartesiana ou tridimensional, o espectro do tubo de raios-X é eliminado por polarização. A redução resultante no fundo espectral permite que se atinjam limites de detecção muito mais baixos (Takeda et al, 2011).

A espectrometria de fluorescência de raios-X por dispersão de energia (EDXRF) é um método que derivou da XRF original. Ele apresenta como vantagens, sobre os métodos anteriores de XRF, como por exemplo, a espectrometria por fluorescência de raios-X por dispersão do comprimento de onda(WDXRF) a estabilidade instrumental e a capacidade de determinação simultânea de vários elementos. O método EDXRF usa directamente raios-x não polarizados emitidos a partir de um tubo de raios-X como radiação excitada. O nível inferior é elevado devido à dispersão dos raios-x a partir da amostra. Como consequência os níveis de detecção são reduzidos para elementos de traço, especialmente em matrizes que contêm elementos leves como matérias vegetais e amostras de solos. (Hettipathirana, 2004). A fusão tem sido usada em preparação de amostras para determinação de iodo e consiste na reacção da amostra sólida com um fundente a altas temperaturas, transformando a estrutura da amostra de forma que ela possa ser analisada directamente por espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF). (Varga, 2007).

Exemplo de execução do método

Em 2011, Takeda et al estabeleceram um método não destrutivo para a determinação dos conteúdos de iodo e bromo em amostras de solo, utilizando espectrometria de fluorescência de raio x por dispersão de energia (EDXRF). A intensidade com correcção matricial de bromo e iodo a partir de grânulos de solo comprimido foi calibrada e os seus conteúdos medidos por ICP-MS após preparação da amostra por pirohidrólise. Foram utilizados 5 materiais de referência de solos, NDG-1, NDG-2, NDG-3, NDG-4 and NDG-5 e medidos por EDXRF em comparação com as concentrações de bromo e iodo. As medições por fluorescência de raios-X foi efectuada num espectómetro de polarização EDXRF, Epsilon 5, como se pode observar na figura 18 .

As curvas de calibração para o bromo e o iodo foram obtidas e as concentrações variaram entre 3,8 e 223mg/kg-1 e entre 0,91 e 54mg/kg-1 respectivamente. Foram efectuadas análises repetidas da mesma amostra com EDXRF entre 1 dia e 1,5 anos, demonstrando boa reproductibilidade dos resultados avaliados. Os limites de detecção mínimos para as amostras de bromo e iodo foram 0,14 mg/kg-1 e 0,34 mg/kg-1 respectivamente. O método analítico para os conteúdos totais de bromo e iodo nas amostras é não destrutivo, apropriado para análise de rotina, simples e rápido.



Figura 18: Espectómetro de polarização EDXRF, Epsilon 5

2.2 Os isótopos de iodo

Embora este não seja o tema central da monografia, é relevante mencionar os avanços recentes das determinações de iodo nuclear, o qual passou a ser o centro das atenções, após a catástrofe de Fukushima em 2011.

O desastroso acidente na central nuclear de Fukushima Daiichi em março de 2011 levou a elaboração de numerosos artigos científicos, investigando a libertação de plutônio e ^{129}I . Steinhäuser (2014) reentamente resumiu a maioria dos estudos acerca de Fukushima, incluindo aqueles que incluíam espectrometria de aceleração de massa para a determinação de plutônio e ^{129}I . Miyake et al (2013) demonstraram que o isótopo de iodo de vida longa, ^{129}I (semi-vida de 15.7 Ma), pode ser uma excelente ferramenta para reconstruir a dosimetria de radiação do isótopo de tempo de semi vida curto, ^{131}I (semi-vida de 8 dias), através da análise de diversas amostras superficiais do solo recolhidas na periferia de Fukushima, , para as quais o nível de ^{131}I ainda teria de ser medido. Além do Plutônio, Shinonaga et al (2014) identificaram urânio de origem não natural, proveniente de Fukushima em amostras de aerossóis a distância de 120 kms, poucos dias depois do acidente. Tornou-se óbvio que esta libertação indesejada nos preocupará durante um longo período de tempo.

3. Análise comparativa de métodos

No estudo que foi realizado foram encontrados 6 métodos de determinação do teor de iodo, Método colorimétrico, Irradiação com activação de núcleo, Cromatografia, Electroforese capilar, Conversão ao estado atómico seguido de medida de emissão ou absorção de massa e com Raios-X. De entre as publicações analisadas, 62% adoptaram um método de conversão ao estado atómico seguido de medida de emissão ou absorção de massa, sendo o mais prevalente o método ICP-MS. Esta prevalência deveu-se ao exelente limite de detecção da técnica, á sua elevada sensibilidade e á capacidade de análise multielementar.

Quanto ao tipo de amostras, em 29% dos artigos analisados foi determinado o teor de iodo em alimentos provenientes do mar. 7 artigos era referentes a determinações de iodo em amostras de leite, 6 outros referentes a determinação de iodo em tecidos e amostras biológicas e ainda outros 6 artigos referentes á determinação de iodo em amostras de sal de mesa. Nas restantes publicações investigaram-se os teores de iodo em amostras de água, ar atmosférico, produtos farmacêuticos, alimentos, entre outros.

Nos 34 artigos estudados, encontraram-se métodos com diferentes graus de aplicabilidade e custo. Os métodos referidos apresentaram-se em ordem crescente de complexidade de execução.

Seguidamente iremos agrupar os métodos de determinação de iodo por tipo de amostra e observar qual dos métodos é mais prevalente dentro do nosso universo de 34 artigos.

Irão existir métodos que irão aparecer repetidos, pois em alguns artigos foram analisados diferentes tipos de amostras, com o mesmo método de determinação, como poderemos ver na tabela 9.

Tabela 9 : Tipos de amostra agrupados por método de determinação de iodo

Tipo de amostra	Método de determinação	Artigo
Ar	ICP-MS	Picoloto et al, 2014
	GC-MS	Pang, Carpenter & Lewis, 2015
	ICP-MS	Sun et al, 2010
Água	HPLC-SF-ICP-MS	Zheng, Yamada & Yoshida, 2011
	SF-ICP-MS	Zheng et al, 2012
	USN-VG-ICP-OES	Matusiewicz & Slachcinski, 2010
	RP-HPLC-ICP-MS	Han et al, 2012
Amostras biológicas e tecidos	IC-ICP-MS	Michalke & Witte, 2014
	CE	Macedo et al, 2014
	Colorimetria	Hedayati et al, 2011
	Colorimetria	Jooste & Strydom, 2010
	Colorimetria	Tonacchera et al 2013
	CPAA	Wojcik, Zagrodzki, Mietelski & Was, 2012
Alimentos do mar	ICP-MS	Romaris-Hortas et al, 2011
	HPLC-ICP-MS	Romaris-Hortas, Barreta & Pinero, 2012
	ICP-MS	Romaris-Hortas et al, 2012
	ICP-MS	Mesko et al 2014

	ICP-MS	Hartwig et al, 2014
	RP-HPLC-ICP-MS	Han et al, 2012
	HPLC	Nitschke & Stengel, 2015
	Espectometria fluorescência atômica	Lu et al, 2013
	OES	Yu et al, 2013
	ENAA	Fukushima & Chatt, 2012
Leite	USN-VG-ICP-OES	Matusiewicz & Slachcinski, 2010
	ICP-MS	Mesko et al, 2010
	ICP-MS	Leppänen, Niemelä & Perämäki, 2014
	ICP-MS	Huynh et al, 2015
	FAAS	Yebra&Bollaín, 2010
	Cromatografia ionica	Shinoda et al, 2011
	INAA-CSS	Isaac-Olive & Chatt, 2012
Sal de mesa	USN-VG-ICP-OES	Matusiewicz & Slachcinski, 2010
	Colorimetria	Jooste & Strydom, 2010
	ICP-MS	Lipiec et al, 2012
	HPLC	Gupta et al, 2011
	ICP-OES	Oliveira, Nóbrega & Pereira-Filho, 2012
	OES	Yu et al, 2013
Amostra solo	EDXRF	Takeda et al, 2011

Compostos farmacêuticos	ICP-MS	Muller, 2012
-------------------------	--------	--------------

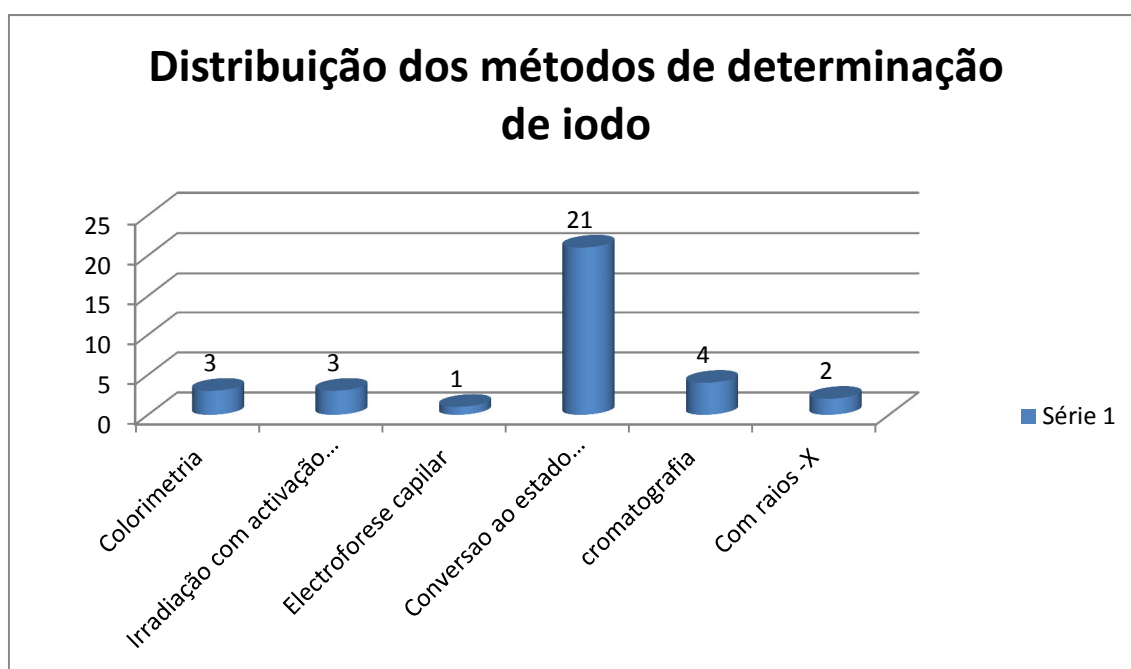


Figura 19: Distribuição dos artigos analisados por métodos de determinação de iodo

Relativamente ao tipo de amostra, para a análise das amostras de ar atmosférico, o método de eleição escolhido foi o ICP-MS. Tem sido dada especial atenção ao estudo do iodo e do bromo no ar e partículas atmosféricas, devido a destruição do ozono atmosférico.

Para a determinação das espécies de iodo na água, foram efectuados 4 estudos, todos eles utilizando ICP-MS ou métodos derivados deste, como método de eleição

Na determinação do teor de iodo em amostras biológicas e tecidos, a prevalência da escolha do método recaiu sobre a colorimetria, pois apesar de ser um método menos

utilizado recentemente para outro tipo de derminações, ainda é muito utilizado em estudos epidemiológicos, devido ao seu baixo custo, essencialmente na determinação de iodo urinário.

Na determinação do teor do iodo em alimentos provenientes do mar, mais uma vez se verifica o predomínio da utilização do método ICP-MS, apesar de também terem sido utilizados métodos cromatográficos e por irradiação com activação do núcleo.

Na determinação de iodo no leite, mais uma vez se verifica a predominância de utilização dos métodos de conversão ao estado atómico, seguido de emissão ou de massa.

Na determinação de iodo em sal de mesa o método ICP também foi o mais utilizado, apesar de também ter sido utilizada a colorimetria e a cromatografia.

A determinação de iodo na amostra de solo foi efectuada por Fluorescência por raios-X. Este método é actualmente um dos mais utilizados em geologia, análises ambientais e mineração.

Na análise de compostos farmacêuticos, o método utilizado foi o ICP-MS.

Como se pode verificar na figura 19, os artigos analisados ao longo deste trabalho, recaíram essencialmente em métodos de conversão ao estado atómico seguido de medida de emissão ou de absorção ou de massa, essencialmente o método ICP-MS. Actualmente este é o método de referência em análise de amostras biológicas, devido essencialmente á sua exactidão, precisão, robustez, análise multielementar, rapidez e selectividade. Este seria decerto o método de eleição para a determinação do teor de iodo na grande maioria das amostras, não fosse o seu elevado custo associado. Apesar de ser um método menos preciso e exacto, na determinação do iodo urinário ainda hoje se utiliza com alguma frequência o método colorimétrico, essencialmente em estudos epidemiológicos, devido ao seu baixo custo. No entanto, para uma monitorização a longo prazo, numa amostra mais pequena, o método ICP-MS revelou ser muito mais adequado.

Referências Bibliográficas

- Aldahan, A., Persson, S., Possnert, G., & Hou, X. L. (2009). Distribution of ^{127}I and ^{129}I in precipitation at high European latitudes. *Geophysical Research Letters*, 36(11).
- Amirav, A., Gordin, A., Poliak, M., & Fialkov, A. B. (2008). Gas chromatography-mass spectrometry with supersonic molecular beams. *Journal of mass spectrometry*, 43(2), 141-163.
- Anastos, N., Barnett, N. W., & Lewis, S. W. (2005). Capillary electrophoresis for forensic drug analysis: a review. *Talanta*, 67(2), 269-279.
- Barbosa, J. T. P., Santos, C. M. M., dos Santos Bispo, L., Lyra, F. H., David, J. M., Korn, M. D. G. A., & Flores, E. M. M. (2013). Bromine, chlorine, and iodine determination in soybean and its products by ICP-MS after digestion using microwave-induced combustion. *Food Analytical Methods*, 6(4), 1065-1070.
- Błażewicz, A. (2012). A review of spectrophotometric and chromatographic methods and sample preparation procedures for determination of iodine in miscellaneous matrices. *Edited by Jamal Uddin*, 371.
- Brownstein D. (2009) Iodine why you need it why you can't live without it (fourth edition). Medical Alternative Press: Michigan.
- Boss, C. B., & Fredeen, K. J. (2004). Concept instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectroscopy, Perkin-Elmer, Bridgeport Avenue Shelton.
- Carpenter, Lucy J., et al. "Atmospheric iodine levels influenced by sea surface emissions of inorganic iodine." *Nature Geoscience* 6.2 (2013): 108-111.
- Choengchan, N., Lukkanakul, K., Ratanawimarnwong, N., Waiyawat, W., Wilairat, P., & Nacapricha, D. (2003). Use of pseudo-first order kinetics in flow injection for determination of trace inorganic iodine. *Analytica chimica acta*, 499(1), 115-122.
- Fukushima, M., & Chatt, A. (2012). Estimation of total as well as bioaccessible levels and average daily dietary intake of iodine from Japanese edible seaweeds by epithermal neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 294(3), 471-478.

Gupta, M., Pillai, A. K., Singh, A., Jain, A., & Verma, K. K. (2011). Salt-assisted liquid–liquid microextraction for the determination of iodine in table salt by high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Food Chemistry*, 124(4), 1741-1746.

Hedayati, M., Khazan, M., Yaghmaee, P., Yeghaneh, M. Z., Behdadfar, L., & Daneshpour, M. S. (2011). Rapid microwave digestion and microplate reading format method for urinary iodine determination. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49(2), 281-284.

Huynh, D., Zhou, S. J., Gibson, R., Palmer, L., & Muhlhausler, B. (2015). Validation of an optimized method for the determination of iodine in human breast milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) after tetramethylammonium hydroxide extraction. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 29, 75-82.

Han, X., Cao, L., Cheng, H., Liu, J., & Xu, Z. (2012). Determination of iodine species in seaweed and seawater samples using ion-pair reversed phase high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Methods*, 4(10), 3471-3477.

Hartwig, C. A., Toralles, I. G., Crizel, M. G., Muller, A. L. H., Picoloto, R. S., Flores, E. M. M., & Mesko, M. F. (2014). Determination of bromine and iodine in shrimp and its parts by ICP-MS after decomposition using microwave-induced combustion. *Analytical Methods*, 6(18), 7540-7546.

Hettipathirana, T. D. (2004). Simultaneous determination of parts-per-million level Cr, As, Cd and Pb, and major elements in low level contaminated soils using borate fusion and energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry with polarized excitation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 59(2), 223-229.

Iodine (2005, August) Human Health Fact Sheet, *Argonne National Laboratory, EVS*.

Ito, K. (1999). Semi-micro ion chromatography of iodide in seawater. *Journal of Chromatography A*, 830(1), 211-217.

Isaac-Olive, K., & Chatt, A. (2012). Studies of total, organic and inorganic iodine in Canadian bovine milk samples with varying milk fat content using ion-exchange chromatography and neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 294(3), 479-486.

Iodine Network (2011). Iodine Market Situation. Briefing Note for Universal Salt Iodization Program Stakeholders Prepared by GAIN, MI and UNICEF. September 13, 2011. [http://www.iodinenetwork.net/documents/110913_Iodine% 20Supply%20 Note%20 FINAL.pdf](http://www.iodinenetwork.net/documents/110913_Iodine%20Supply%20Note%20FINAL.pdf)

International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders (ICCIDD). (2012) How much iodine? Ver : <http://www.iccidd.org/p142000266.html>

Jooste, P. L., & Strydom, E. (2010). Methods for determination of iodine in urine and salt. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 24(1), 77-88.

Johnson, C.C. (2003). The geochemistry of iodine and its application to environmental strategies for reducing the risks from iodine deficiency disorders (IDD). British Geological Survey <http://www.bgs.ac.uk/home.html>.

Kitson, F. G., Larsen, B. S., & McEwen, C. N. (1996). *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. Academic Press. Kitson, Larsen & McEwen(1996)

Leppänen, K., Niemelä, M., & Perämäki, P. (2014). Development of an Efficient Acid Digestion Procedure Utilizing High-Pressure Asher Technique for the Determination of Iodine and Metallic Elements in Milk Powder. *Food analytical methods*, 7(5), 1103-1108.

Lipiec, E., Warowicka, O., Ruzik, L., Zhou, Y., Jarosz, M., & Połec-Pawlak, K. (2012). Investigation of iodine bioavailability from chicken eggs versus iodized kitchen salt with in vitro method. *European Food Research and Technology*, 234(5), 913-919.

Lu, J. P., Tan, F. W., Tang, Q., & Jiang, T. C. (2013). Novel method for indirect determination of iodine in marine products by atomic fluorescence spectrometry. *Chemical Research in Chinese Universities*, 29(1), 26-29.

Lopes, M. S., de Castro, J. J., Marcelino, M., Oliveira, M. J., Carrilho, F., & Limbert, E. (2012). Iodine and thyroid: what a clinic should know. *Acta Médica Portuguesa*, 25(3), 174-178.

Limbert, E., Prazeres, S., São Pedro, M., Madureira, D., Miranda, A., Ribeiro, M., ... & Borges, F. (2010). Iodine intake in Portuguese pregnant women: results of a countrywide study. *European journal of endocrinology*, 163(4), 631-635.

Macedo, A. N. D., Teo, K., Mente, A., McQueen, M. J., Zeidler, J., Poirier, P., ... & Britz-McKibbin, P. (2014). A robust method for iodine status determination in

epidemiological studies by capillary electrophoresis. *Analytical chemistry*, 86(20), 10010-10015.

Meskoa, M. F., Torallesa, I. G., Crizela, M. G., Costaa, V. C., Rodrigo, N., Piresb, X., ... & Melloc, P. A. (2014). DETERMINAÇÃO DE BROMO E IODO EM ALGA MARINHA COMESTÍVEL POR ICP-MS APÓS DECOMPOSIÇÃO POR COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS. *Quim. Nova*, 37(6), 964-968.

Mesko, M. F., Mello, P. A., Bizzi, C. A., Dressler, V. L., Knapp, G., & Flores, É. M. (2010). Iodine determination in food by inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(2), 1125-1131.

Michalke, B., & Witte, H. (2015). Characterization of a rapid and reliable method for iodide biomonitoring in serum and urine based on ion chromatography–ICP-mass spectrometry. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 29, 63-68.

Muller, A. L., Mello, P. A., Mesko, M. F., Duarte, F. A., Dressler, V. L., Muller, E. I., & Flores, E. M. (2012). Bromine and iodine determination in active pharmaceutical ingredients by ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27(11), 1889-1894.

Matusiewicz, H., & Ślachciński, M. (2010). In situ vapor generation inductively coupled plasma spectrometry for determination of iodine using a triple-mode microflow ultrasonic nebulizer after alkaline solubilization. *Analytical Methods*, 2(10), 1592-1598.

Miyake, Y. (2013). Estimation of isotopic abundance ratio of radioiodine originated from the Fukushima nuclear power plant accident.

Manning, T. J., & Grow, W. R. (1997). Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *The chemical educator*, 2(1), 1-19.

Nitschke, U., & Stengel, D. B. (2015). A new HPLC method for the detection of iodine applied to natural samples of edible seaweeds and commercial seaweed food products. *Food chemistry*, 172, 326-334.

Oliveira, A. A., Nóbrega, J. A., Pereira-Filho, E. R., & Trevizan, L. C. (2012). Evaluation of ICP OES with axial or radial views for determination of iodine in table salt. *Química Nova*, 35(7), 1299-1305.

- Ohashi, T., Yamaki, M., Pandav, C. S., Karmarkar, M. G., & Irie, M. (2000). Simple microplate method for determination of urinary iodine. *Clinical chemistry*, 46(4), 529-536.
- Orešćanin, V., Mikelić, I. L., Mikelić, L., & Lulić, S. (2008). Applicability of MiniPal 4 compact EDXRF spectrometer for soil and sediment analysis. *X-Ray Spectrometry*, 37(5), 508-511.
- Pang, X., Carpenter, L. J., & Lewis, A. C. (2015). Microfluidic derivatisation technique for determination of gaseous molecular iodine with GC–MS. *Talanta*.
- Picoloto, R. S., Cruz, S. M., Mello, P. A., Muller, E. I., Smichowski, P., & Flores, E. M. (2014). Combining pyrohydrolysis and ICP-MS for bromine and iodine determination in airborne particulate matter. *Microchemical Journal*, 116, 225-229.
- Romarís-Hortas, V., Bermejo-Barrera, P., & Moreda-Piñeiro, A. (2012). Development of anion-exchange/reversed-phase high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry methods for the speciation of bio-available iodine and bromine from edible seaweed. *Journal of Chromatography A*, 1236, 164-176.
- Romarís-Hortas, V., Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, J., & Moreda-Piñeiro, A. (2012). Speciation of the bio-available iodine and bromine forms in edible seaweed by high performance liquid chromatography hyphenated with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 745, 24-32.
- Romarís-Hortas, V., García-Sartal, C., del Carmen Barciela-Alonso, M., Domínguez-González, R., Moreda-Piñeiro, A., & Bermejo-Barrera, P. (2011). Bioavailability study using an in-vitro method of iodine and bromine in edible seaweed. *Food Chemistry*, 124(4), 1747-1752.
- Shinoda, T., Miyamoto, N., Kuromoto, T., Ito, K., Morikawa, H., Okamoto, Y., ... & Hirokawa, T. (2012). Pyrohydrolysis coupled to ion chromatography for sensitive determination of iodine in food-related materials. *Analytical Letters*, 45(8), 862-871.
- Sun, M., Gao, Y., Wei, B., & Wu, X. (2010). Determination of iodine and bromine in coal and atmospheric particles by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 81(1), 473-476.

Steinhauser, G., Brandl, A., & Johnson, T. E. (2014). Comparison of the Chernobyl and Fukushima nuclear accidents: a review of the environmental impacts. *Science of the Total Environment*, 470, 800-817.

Shinonaga, T., Steier, P., Lagos, M., & Ohkura, T. (2014). Airborne plutonium and non-natural uranium from the Fukushima DNPP found at 120 km distance a few days after reactor hydrogen explosions. *Environmental science & technology*, 48(7), 3808-3814.

Skoog, D. A. (2002). Holler, F.J.; Nieman, T.A. *Principles of Instrumental Analysis*, 5.

Skoog, D., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis*, 6th edn, Brooks.

Takeda, A., Yamasaki, S. I., Tsukada, H., Takaku, Y., Hisamatsu, S. I., & Tsuchiya, N. (2011). Determination of total contents of bromine, iodine and several trace elements in soil by polarizing energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry. *Soil Science and Plant Nutrition*, 57(1), 19-28.

Tonacchera, M., Dimida, A., De Servi, M., Frigeri, M., Ferrarini, E., De Marco, G., ... & Vitti, P. (2013). Iodine fortification of vegetables improves human iodine nutrition: in vivo evidence for a new model of iodine prophylaxis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(4), E694-E697.

Trokhimenko, O. M., & Zaitsev, V. N. (2004). Kinetic Determination of Iodide by the Sandell–Kolthoff Reaction Using Diphenylamine-4-Sulfonic Acid. *Journal of analytical chemistry*, 59(5), 491-494.

Varga, I. (2007). Iodine determination in dietary supplement products by TXRF and ICP-AES spectrometry. *Microchemical journal*, 85(1), 127-131.

Vékey, K. (2001). Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *Journal of Chromatography A*, 921(2), 227-236.

Weis, J. (2008). *Ion chromatography*. John Wiley & Sons.

World Health Organization/International Council for the Control of the Iodine Deficiency Disorders/ United Nations Children's Fund (WHO/ICCIDD/UNICEF). Assessment of the iodine deficiency disorders and monitoring their elimination, 3rd edition, Geneva, 2007.

Wójcik, A. K., Zagrodzki, P., Mietelski, J. W., & Wąs, B. (2012). Determination of iodine concentration in aqueous solutions by proton activation analysis: preliminary results for digested human thyroids. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 291(2), 415-419.

Yebra, M. C., & Bollaín, M. H. (2010). A simple indirect automatic method to determine total iodine in milk products by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 82(2), 828-833.

Yu, Yong-Liang, et al. "Iodine excitation in a dielectric barrier discharge micro-plasma and its determination by optical emission spectrometry." *Analyst* 138.6 (2013): 1719-1725.

Zimmermann, M. B. (2007). The impact of iodised salt or iodine supplements on iodine status during pregnancy, lactation and infancy. *Public health nutrition*, 10(12A), 1584-1595.

Zimmermann, M. B. (2009). Iodine deficiency in pregnancy and the effects of maternal iodine supplementation on the offspring: a review. *The American journal of clinical nutrition*, 89(2), 668S-672S.

Zimmermann, M. B., & Andersson, M. (2012). Assessment of iodine nutrition in populations: past, present, and future. *Nutrition reviews*, 70(10), 553-570.

